

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORIA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRÍCOLAS CON ÉNFASIS EN
PROTECCIÓN VEGETAL

DETECCIÓN MOLECULAR DE BEGOMOVIRUS EN MALEZAS ASOCIADAS
AL CULTIVO DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.)
EN EL DISTRITO DE LOS SANTOS

YATZARI LESLIE ORTIZ SÁNCHEZ

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS AGRÍCOLAS CON ÉNFASIS EN
PROTECCIÓN VEGETAL

CHIRIQUÍ, PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2018

**DETECCIÓN MOLECULAR DE BEGOMOVIRUS EN MALEZAS ASOCIADAS
AL CULTIVO DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.)
EN EL DISTRITO DE LOS SANTOS**

TESIS

**Sometida para optar por el título de Maestría en Ciencias Agrícolas
con énfasis en Protección Vegetal**

VICERRECTORIA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO

**Permiso para su publicación y reproducción total y parcial, debe ser obtenido en la
Vicerrectoría de Investigación y Postgrado**

APROBACIÓN

SIMÓN A. VÁSQUEZ W., *MSc.*

Asesor

MAIRA E. DÍAZ V., *Ph. D*

Jurado

EDDY BARRAZA, *Ph. D*

Jurado

DEDICATORIA

A Dios que me da la vida y la fortaleza para seguir avanzando.

A mis hijos porque me impulsan e inspiran a ser mejor cada día.

A mi esposo porque me acompaña y me sostiene cuando me faltan fuerzas.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por hacer de estos tres (3) años una oportunidad para crecer y vencer miedos, por las personas que me acompañaron, por las lecciones aprendidas y obstáculos superados.

A mi director de tesis, el Ing. Simón Vásquez *MSc.* por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica, por su tiempo, paciencia y por permitirme trabajar en un marco de confianza y libertad fundamentales para la realización de este trabajo y para la formación profesional. También por contestar todas las preguntas, al inicio del Programa de Maestría, producto de la ansiedad que me provocaba terminar satisfactoriamente esta etapa de estudio. Y por permitir, con confianza, que se desarrollara en el Laboratorio de Biología Molecular, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias, provincia de Chiriquí.

Al profesor José A. Herrera *PhD* por servir de enlace con el proyecto de investigación “Identificación molecular de Begomovirus en arvenses asociadas a cultivos de tomate en el Distrito de Los Santos” y con ello posibilitar el desarrollo del trabajo de tesis que me permitirá obtener el título de Magister en Ciencias Agrícolas con énfasis en Protección Vegetal.

A la investigadora Maira Díaz *PhD*, encargada del proyecto de investigación antes mencionado y asesora del trabajo de tesis. Le agradezco por aceptar mi participación en el estudio y permitir el desarrollo de mi tesis de grado. Gracias por confiar en mis capacidades y brindarme la oportunidad de instruirme en técnicas de detección molecular. Su colaboración como asesora durante todo este proceso de aprendizaje fue clave. Gracias por los artículos que me envió, los e-mails y WhatsApp que contestó, gracias por la paciencia, no tengo manera de devolver la confianza depositada en mí.

Al equipo de investigadores conformado por el Ing. Orlando Osorio *MSc.* por la colaboración durante los muestreos e identificaciones de las arvenses colectadas. Y al profesor Juan Bernal *PhD* por mantenerse interesado y disponible ante cualquier consulta formulada.

A la Licenciada Rosemarie Serrano, quien estuvo en todo momento disponible ante cualquier necesidad que se presentara en el Laboratorio durante la ejecución de los análisis. Gracias por la atención, las sonrisas y la buena disposición siempre.

A mi pareja y compañero, Víctor, por las largas conversaciones que me ayudaron a comprender de mejor manera procesos y demás. Le agradezco por no dejarme sola, por alentarme y caminar conmigo mientras se daba este proceso de aprendizaje en el cual ambos ganamos destrezas y momentos de complicidad.

A mis hijos, por ser mi motor, por ser la razón más maravillosa que me lleva a la superación. Agradezco el tiempo sacrificado durante estos tres (3) años para permitirme lograr las metas trazadas. El camino no fue fácil, pero con gran satisfacción puedo decirles que ¡lo logramos!

A mis amigas incondicionales, Milena e Ingrid que estuvieron siempre dispuestas a escucharme, me dieron ánimos y la vitalidad necesaria en momentos cuando pensé no tener la capacidad para continuar.

Agradezco a la Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología (SENACYT) por los fondos asignados a la investigadora Maira Díaz *PhD* por el Proyecto ITE15-008 mediante el programa de Reinserción de Talento Especializado sin el cual no hubiese sido posible el desarrollo de este trabajo.

Siempre estaré agradecida con todas estas personas que fueron partícipe de este recorrido y que solo llegaron a mi vida con la intención de dar, mil gracias.

“Cuando practicas la gratitud, existe un sentido de respeto hacia los demás”

Dalai Lama

CONTENIDO

APROBACIÓN	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTO	iv
CONTENIDO	vi
ÍNDICE DE CUADROS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
ABREVIATURAS UTILIZADAS.....	xv
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
ASPECTOS GENERALES.....	3
1.1 Introducción	3
1.2 Objetivos	5
1.2.1 Objetivo general	5
1.2.2 Objetivos específicos	5
1.3 Hipótesis.....	6
FUNDAMENTACIÓN TEORICA.....	7
2.1. Características generales de la familia Geminiviridae	7
2.2. Clasificación taxonómica de la familia Geminiviridae	9

2.3.	El Género Begomovirus.....	11
2.4.	Estructura genómica de los Begomovirus.....	13
2.5.	Expresión de genes en Begomovirus	15
2.6.	Función de las proteínas	16
2.7.	Mecanismo de replicación	18
2.8.	Tropismo de la infección por la familia Geminiviridae.....	19
2.9.	Epidemiología de los Begomovirus.....	19
2.10.	Arvenses como hospedero de Begomovirus	20
2.11.	Distribución y diversidad de Begomovirus en arvenses para Latinoamérica	21
2.12.	Arvenses con Begomovirus en Panamá.....	22
2.13.	Detección e identificación de la familia Geminiviridae	23
2.14.	Detección por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	24
3.1.	Área de estudio	26
3.1.1.	Clima	28
3.2.	Colecta de arvenses	29
3.2.1.	Densidad de arvenses en las parcelas	29
3.2.2.	Colecta de muestras para detección de Begomovirus.....	29
3.3.	Conservación de las muestras	30
3.4.	Identificación taxonómica de arvenses colectadas	30
3.5.	Análisis estadístico	31
3.6.	Variables	32
3.7.	Método de diagnóstico	32
3.7.1.	Extracción de ADN total por el método de Dellaporta modificado.....	32
3.7.2.	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y electroforesis en gel de agarosa 1.5%	34

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
4.1 Identificación taxonómica de las arvenses asociadas al cultivo de tomate	
<i>(S. lycopersicum)</i> industrial en el distrito de Los Santos.....	37
4.2 Detección de Begomovirus en arvenses asociadas al cultivo de tomate industrial	
mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	40
4.2.1. Detección de Begomovirus en las especies de arvenses asociadas al cultivo de	
tomate industrial colectadas en el distrito de Los Santos analizadas mediante	
PCR	42
4.2.2. Detección de Begomovirus en arvenses sintomáticas y asintomáticas asociadas al	
cultivo de tomate industrial en el distrito de Los Santos analizadas mediante PCR	
.....	45
4.2.3. Detección de Begomovirus en época de cultivo y barbecho en arvenses asociadas	
al cultivo de tomate industrial en el distrito de Los Santos analizadas mediante	
PCR	49
CONCLUSIONES.....	53
RECOMENDACIONES.....	55
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	56
ANEXOS.....	68

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO NO.		PÁGINA
I	Clasificación taxonómica actual de la familia Geminiviridae.....	10
II	Proteínas asociadas a la replicación en el genoma de los Begomovirus bipartitas.....	17
III	Registro de las áreas de producción de tomate industrial muestreadas durante la temporada 2016-2017.....	28
IV	Soluciones requeridas para preparar el amortiguador de extracción de Dellaporta (Dellaporta <i>et al.</i> , 1983).....	33
V	Secuencias de nucleótidos de los cebadores degenerados utilizados para amplificar el ADN viral.....	34
VI	Identificación taxonómica de las arvenses asociadas al cultivo de tomate (<i>S. lycopersicum</i>) presentes en las fincas ubicadas en el distrito de Los Santos.....	38
VII	Prevalencia de las especies de arvenses asociadas al cultivo de tomate industrial en el distrito de Los Santos diagnosticadas por PCR.....	43

VIII	Prevalencia de Begomovirus en arvenses sintomáticas vs. asintomáticas asociadas al cultivo de tomate industrial colectadas en el distrito de Los Santos (datos transformados por $\sqrt{x+2}$).....	46
IX	Prevalencia de Begomovirus en la época de cultivo vs. la de barbecho en arvenses asociadas al cultivo de tomate industrial en el distrito de Los Santos mediante PCR (datos transformados por $\sqrt{x+2}$).....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA NO.		PÁGINA
1	Representación del genoma de Geminivirus bipartita.....	8
2	Representación esquematizada de los genomas de los principales grupos del género Begomovirus.....	13
3	Tamaño de ambos segmentos de ADN en el genoma de los Begomovirus.....	14
4	Localización de la secuencia de origen de replicación de los Begomovirus.....	16
5	Mapa representativo de la distribución geográfica en Latinoamérica y el Caribe de arvenses positivas a infección viral por Begomovirus.....	21
6	Ubicación geográfica de las fincas de tomate industrial muestreadas en el distrito de Los Santos durante la temporada 2016-2017.....	27
7	Ubicación de la región conservada de 550 pares de bases (pb) de manera específica en el género Begomovirus.....	35

8	Peso molecular de muestras positivas a Begomovirus y marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder en gel de agarosa 1.5%.....	36
9	Resultado de la amplificación de ADN de Begomovirus en muestras de arvenses asociadas al cultivo de tomate industrial en el distrito de Los Santos.....	41
10	Pellet obtenido al final de las extracciones utilizando el protocolo de Dellaporta.....	77

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO NO.		PÁGINA
1	Vista general de las fincas dedicadas al cultivo de tomate industrial durante la temporada de cultivo 2016-2017.....	68
2	Arvenses sintomáticas de infección viral colectadas en la jornada de muestreo en el cultivo de tomate industrial realizada en la provincia de los Santos.....	69
3	Arvenses sin síntomas visibles de infección viral colectadas en la jornada de muestreo en el cultivo de tomate industrial realizada en la provincia de los Santos.....	70
4	Plantas de tomate (<i>S. lycopersicum</i>) variedad IDIAP T-8 con síntomas de infección viral presentes en las fincas tomateras en el distrito de Los Santos.....	71
5	Arvenses reportadas como hospederas de Begomovirus en la región de Latinoamérica y el Caribe.....	72
6	Vista parcial del Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Panamá, provincia de Chiriquí.....	74
7	Protocolo de Dellaporta para extracción de ADN total.....	75

8	Procedimiento para la Electroforesis en Gel de Agarosa 1.0-1.5%.....	78
9	Protocolo de amplificación utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	80
10	Resultados de las especies de arvenses sintomáticas y asintomáticas asociadas al cultivo de tomate industrial evaluadas mediante PCR durante la temporada 2016-2017 en el distrito de Los Santos.....	83

ABREVIATURAS UTILIZADAS

(por orden alfabético)

VIRUS

AbBV: *Abutilon Brazil virus* (virus del *Abutilon* de Brazil).

AbMBoV: *Abutilon mosaic Bolivia virus* (virus del mosaico de *Abutilon* de Bolivia).

CalGMV: *Calopogonium golden mosaic virus* (virus del mosaico dorado de *Calopogonium*).

CILCrV: *Cleome leaf crumple virus* (virus de la deformación de la hoja de *Cleome*).

DaturaLDV: *Datura leaf distortion virus* (virus de la distorsión de la hoja de *Datura*).

EuMV: *Euphorbia mosaic virus* (virus del mosaico de *Euphorbia*).

EuYMV: *Euphorbia yellow mosaic virus* (virus del mosaico amarillo de *Euphorbia*).

JacYMV: *Jacquemontia yellow mosaic virus* (virus del mosaico amarillo de *Jacquemontia*).

JacYVV: *Jacquemontia yellow vein virus* (virus de la vena amarilla de *Jacquemontia*).

JMV: *Jatropha mosaic virus* (virus del mosaico de *Jatropha*).

MaYMHV: *Malvastrum yellow mosaic Helshire virus* (virus del mosaico amarillo de *Malvastrum* de Helshire).

MaYMJV: *Malvastrum yellow mosaic Jamaica virus* (virus del mosaico amarillo de *Malvastrum* de Jamaica).

MCLCuV: *Melón chlorotic leaf curl virus* (virus del enrollamiento de la hoja clorótica del melón).

MerMV: *Merremia mosaic virus* (virus del mosaico de *Merremia*).

MGMV: *Macroptilium golden mosaic virus* (virus del mosaico dorado de *Macroptilium*).

RhGMHaV: *Rhynchosia golden mosaic Havana virus* (virus del mosaico dorado de *Rhynchosia* de la Havana).

RhRGMV: *Rhynchosia rugose golden mosaic virus* (virus del mosaico dorado rugoso de *Rhynchosia*).

RhYMYuV: *Rhynchosia yellow mosaic Yucatan virus* (virus del mosaico amarillo de *Rhynchosia* de Yucatán).

SidaGMBrV: *Sida golden mosaic Bravo virus* (virus Bravo del mosaico dorado de *Sida*).

SidaMBoV1: *Sida mosaic Bolivia virus 1* (virus 1 del mosaico de *Sida* de Bolivia).

SidaMBoV2: *Sida mosaic Bolivia virus 2* (virus 2 del mosaico de *Sida* de Bolivia).

SiGMBuV: *Sida golden mosaic Backup virus* (virus del mosaico dorado de *Sida*).

SiGMHV: *Sida golden mosaic Honduras virus* (virus del mosaico dorado de *Sida* en Honduras).

SiGMV-Co: *Sida golden mosaic virus from Costa Rica* (virus del mosaico dorado de *Sida* en Costa Rica).

SimMV: *Sida Micrantha virus* (virus de *Sida Micrantha*).

SiMoV: *Sida mottle virus* (virus del moteado de *Sida*).

SiMSinV: *Sida mosaic Sinaloa virus* (virus del mosaico de *Sida* de Sinaloa).

SiYMoV: *Sida yellow mottle virus* (virus del moteado amarillo de *Sida*).

SIYMV0: *Sida yellow mosaic virus* (virus del mosaico amarillo de *Sida*).

SiYVV: *Sida yellow vein virus* (virus de la vena amarilla de *Sida*).

SLCMV: *Sri Lankan cassava mosaic virus* (virus del mosaico de la yuca de Sri Lanka).

TGMV: *Tomato golden mosaic virus* (virus del mosaico dorado del tomate).

ToLDeV: *Tomato leaf deformation virus* (virus de la deformación de la hoja de tomate).

ToSRV: *Tomato severe rugose virus* (virus rugoso severo del tomate).

WGMSTV: *Wissadula golden mosaic St. Thomas virus* (virus del mosaico dorado de *Wissadula* de St. Thomas).

OTRAS ABREVIATURAS

°C: grados centígrados.

μL: microlitros.

μM: micromol.

ACcorel048: cebador degenerado para Begomovirus.

AVcore494: cebador degenerado para Begomovirus.

CP: *coat protein* (proteína de cubierta o cápsida).

Cp-Core: *coat protein core* (parte central de la secuencia de la proteína de cubierta).

dATP: *deoxyadenosine triphosphate* (trifosfato de desoxiadenosina).

dCTP: *deoxycytidine triphosphate* (trifosfato de desoxicitidina).

dGTP: *deoxyguanosine triphosphate* (trifosfato de desoxiguanosina).

dTTP: *deoxythymidine triphosphate* (trifosfato de desoxitimidina).

DNA: *deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico).

DNA-A: *deoxyribonucleic acid-A* (ácido desoxirribonucleico A).

DNA-B: *deoxyribonucleic acid-B* (ácido desoxirribonucleico-B).

dNTP's: *deoxynucleotide triphosphates* (trifosfato de desoxinucleótido).

dsDNA: *double-stranded DNA* (ADN de cadena doble).

dTTP: *deoxythymidine triphosphate* (desoxitimidina trifosfato).

EDTA: *Ethylene-diamine-tetra-acetic acid* (Ácido etilen-diamino-tetra acético).

GPS: *Global Positioning System* (Sistema de Posicionamiento Global).

IR: *Intergenic Región* (región intergénica).

kb: Kilobase.

kDa: kiloDalton.

MgCl₂: cloruro de magnesio.

ml: mililitros.

mM: milimol.

MP: *movement protein* (proteína de movimiento).

MPM: marcador de peso molecular.

nm: nanómetro.

NSP: *nuclear shuttle protein* (proteína transportadora del núcleo).

NW: *new world* (nuevo mundo).

ORF: *open reading frame* (marco de lectura abierta).

Ori: *origin of replication* (origen de replicación).

OW: *old world* (viejo mundo).

pb: par de bases.

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

pH: *potential of hydrogen* (potencial de hidrógeno).

REn: *Replication enhancer protein* (proteína potenciadora de la replicación).

Rep: *Replication-associated protein* (proteína asociada a la replicación).

ssDNA: *single-stranded DNA* (ADN de cadena simple).

TAE: Tris, Ácido Acético - EDTA.

TrAp: *Transcriptional activator protein* (proteína activadora transcripcional).

UV: *Ultraviolet radiation* (radiación ultravioleta).

WGS84: *World Geodetic System 1984* (Sistema Geodésico Mundial 1984).

ORTIZ, Y. 2018. Detección molecular de begomovirus en malezas asociadas al cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en el distrito de Los Santos. TESIS, MAESTRÍA, UNIVERSIDAD DE PANÁMA. 105 p.

Palabras claves: arvenses, Begomovirus, *Bemisia tabaci*, prevalencia, PCR, reservorio.

RESUMEN

Se realizó una investigación exploratoria en el distrito de Los Santos, provincia de Los Santos, principal área de producción de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) industrial en el país, con el objetivo de determinar la presencia de arvenses infectadas por Begomovirus. El muestreo se realizó en 10 fincas productoras de tomate industrial variedad IDIAP T-8, ubicadas en las localidades de Tres Quebradas, La Limona, La Colorada, San Luis, La Balita, La Espigadilla, La Lomita y La Honda. La colecta se hizo durante la época de cultivo y barbecho, dentro y alrededor del cultivo. Se recolectaron 110 muestras de folíolos apicales de arvenses, de las cuales 33 correspondían a plantas sintomáticas y 77, a asintomáticas. Se realizó la extracción de ADN total por el método de Dellaporta (Dellaporta *et al.*, 1993). Por medio de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando los cebadores degenerados AVCORE 494 y ACCORE 1048 se analizó la presencia de Begomovirus en las arvenses asociadas al cultivo de tomate industrial. En total se detectaron 28 arvenses positivas (26.41%) pertenecientes a seis (6) familias (10 especies) en las fincas muestreadas. De las cuales 21.9% correspondían a arvenses sintomáticas y 16% a asintomáticas. Las familias con mayor prevalencia de infección fueron: Amaranthaceae, con las especies *Amaranthus dubius* Mart. ex Thell. y *A. spinosus* (L.) reportaron 75% de muestras positivas; la familia Solanaceae, específicamente la especie *Physalis angulata* (L.) presentó 66.7%; la familia Fabaceae compuesta por *Calopogonium mucunoides* Desv., *Rhynchosia minima* (L.) DC. y *Mimosa* spp. en conjunto representaron un 64%; la familia Cleomaceae, *Cleome viscosa* (L.) obtuvo 60%; la familia Violaceae *Hybanthus attenuatus* Humb.& Bonpl. ex Roem. & Schult. con 50% y dentro de la familia Malvaceae, *Malachra alceifolia* Jacq., *Malvastrum americanum* (L.) Torr. con 22.5% de plantas infectadas. Estos resultados sugieren que las arvenses predominantes en la zona tomatera del distrito de Los Santos, que crecen dentro y fuera, podrían estar funcionando como reservorio de inóculo primario durante todo el año de esta enfermedad para cultivos de tomate industrial que se plantarían posteriormente en estas áreas o en áreas aledañas. Este trabajo muestra la importancia de incluir en las estrategias de manejo de los cultivos, no solo las plantas cultivadas, sino también las arvenses que las acompañan

ORTIZ, Y. 2018. Molecular detection of Begomovirus in weeds associated with industrial tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivation in Los Santos district. TESIS, MAESTRÍA, UNIVERSIDAD DE PANÁMA. 105 p.

Key words: Begomovirus, *Bemisia tabaci*, host, PCR, prevalence, reservoir, weeds.

ABSTRACT

An exploratory research was performed on weeds growing in the district of Los Santos, province of Los Santos, the main tomato (*Solanum lycopersicum* L.) producing area in the country. The chief goal of this research was to assess prevalence of Begomovirus infection within weed population. The survey was carried on samples coming from 10 farms located in the following towns where IDIAP-T8 variety prevails: Tres Quebradas, La Limona, La Colorada, San Luis, La Balita, La Espigadilla, La Lomita y La Honda. For lab testing, 110 plant samples were collected during crop season and fallow. Among them, 33 samples showed symptoms of alleged viral infection, while remaining 77 looked symptomless. Polymerase Chain Reaction (PCR) technique employing AVCORE 494 and ACCORE 1048 degenerated Primers diagnosed 28 weed samples as positive to Begomovirus infection (26.41%). Positive samples for Begomovirus infection were obtained from all farms surveyed. Weeds belonging to Amarantaceae family (species collected were: *Amaranthus dubius* Mart. ex Thell. and *Amaranthus spinosus* L.) showed a prevalence of 75% of samples infected by Begomovirus; on second place, weeds belonging to family Solanaceae (*Physalis angulata* L. was the only specie sampled) showed a prevalence of 66.7%; family Fabaceae (sample comprised the following species: *Calopogonium mucunoides* Desv., *Rhynchosia minima* L. and *Mimosa* spp. showed a prevalence of 64%; weed specie *Cleome viscosa* L. (Magnoliopsida: Cleomaceae) showed 60%; weeds belonging to the family Violaceae (*Hybanthus attenuatus* Humb. & Bonpl. ex Roem. & Schult. was the only one specie collected) had a prevalence of 50%; among weeds of the Malvaceae family, only the following species collected tested positive to Begomovirus infection: *Malachra alceifolia* Jacq. and *Malvastrum americanum* Torr.) those weeds showed a prevalence of 22.5%. Test results showed above demonstrate that some weeds thriving within tomato plots and its boundaries in the district of Los Santos may be acting as a Begomovirus reservoir for tomato crops throughout the year. This research proves the need to include weed management in a more comprehensive integrated strategy to cope with this type of plant virus complex.

ASPECTOS GENERALES

1.1 Introducción

Según el Departamento de Planificación Sectorial del Ministerio de Desarrollo Agropecuario (MIDA), en el Distrito de Los Santos, es donde se da la mayor producción de tomate industrial en el área de Azuero. De este distrito proviene el 80% del total producido en la provincia de Los Santos (MIDA, 2014).

Como ha ocurrido en muchas áreas destinadas a la producción agrícola con monocultivo intensivo, en esta región se han presentado algunos problemas fitosanitarios que han puesto en peligro la sostenibilidad de la siembra de tomate de tipo industrial (*Solanum lycopersicum* L.) como actividad económica. Una de las plagas más importantes del cultivo de tomate en esta zona es la mosca blanca (*Bemisia tabaci* Gennadius, 1889) (Hemíptera: *Aleyrodidae*), registrada por primera vez en 1983 (Zachrisson & Poveda, 1993; Engel *et al.*, 1998; Morales & Anderson, 2001).

Coincidiendo con lo reportado por Osorio (1998) los síntomas de infección por Geminivirus más comunes en las parcelas de tomate en la península de Azuero son:

- Achaparramiento de las plantas
- Moteado y rizado foliar
- Severa disminución en la cantidad y calidad de los frutos producidos

La Mosca blanca (*B. tabaci*) es una especie cosmopolita capaz de alimentarse sobre una gran cantidad de especies de plantas dicotiledóneas cultivadas, así como también sobre

arvenses que crecen tanto dentro de las áreas destinadas a la producción de cultivos como en sus inmediaciones. Muchas de estas arvenses presentan también síntomas similares a los provocados por las infecciones por Begomovirus. Por esta razón, se sospecha desde hace tiempo que las arvenses pudiesen funcionar no sólo como hospederos alternativos para el vector, sino también como reservorios de algunos Begomovirus de importancia económica dentro del agroecosistema (Brown *et al.*, 1991; Roye *et al.*, 1997; Umaharan *et al.*, 1998; Rojas *et al.*, 2000).

Las condiciones de cultivo a cielo abierto, el clima cálido a lo largo de todo el año y la aparición del biotipo B de mosca blanca en las plantaciones de tomate del distrito de Los Santos ponen a esta actividad en una situación muy riesgosa debido a la elevada probabilidad de que ocurra una epifitía por Begomovirus capaz de llevar a la banca rota especialmente a los pequeños agricultores dedicados a esta actividad económica en esta región del país (Brown *et al.*, 1995).

Actualmente las investigaciones sobre la prevalencia de Begomovirus en la provincia de Los Santos se han enfocado solamente en cultivos de importancia económica, la única referencia sobre arvenses infectadas por Begomovirus la realizó en su tesis de maestría Osorio (1998). No obstante, si se consultan publicaciones internacionales quedará muy claro la importancia que en muchos países se les asignan a las arvenses como reservorio de virosis para el cultivo de tomate. Por esta razón, consideramos que es relevante determinar la prevalencia de arvenses infectadas por Begomovirus en el cultivo de tomate en el distrito de Los Santos, hecho que permitirá a los tomateros azuerenses perfeccionar su estrategia de manejo integrado del complejo Mosca blanca-Begomovirus.

El objetivo de este trabajo es realizar un estudio preliminar de detección de infección por Begomovirus en las arvenses que coexisten en las plantaciones de tomate del distrito de Los Santos, provincia de Los Santos, República de Panamá.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

1. Determinar la presencia de Begomovirus en las arvenses asociadas al tomate (*S. lycopersicum*) industrial en el arco seco de Azuero durante las épocas de cultivo y barbecho.

1.2.2 Objetivos específicos

1. Identificar las arvenses asociadas al cultivo de tomate (*S. lycopersicum*) presentes en las fincas ubicadas en el distrito de Los Santos.
2. Detectar la presencia de Begomovirus en arvenses debidamente identificadas provenientes de parcelas dedicadas al cultivo de tomate (*S. lycopersicum*) en el distrito de Los Santos durante las épocas de cultivo y barbecho mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando los cebadores degenerados AVCORE 494 y ACCORE 1048.
3. Contrastar las muestras positivas y negativas a Begomovirus resultantes de la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando los cebadores degenerados AVCORE 494 y ACCORE 1048, para estimar la prevalencia de cada grupo de ellas en las parcelas dedicadas al cultivo de tomate (*S. lycopersicum*) en el distrito de Los Santos durante las temporadas de cultivo y de barbecho.

1.3 Hipótesis

Hi1: Hay arvenses hospedadas de *Bemisia tabaci* (Gennadius) infectadas por Begomovirus creciendo en fincas tomateras en el distrito de Los Santos.

Ho1: No hay arvenses hospedadas de *Bemisia tabaci* (Gennadius) infectadas por Begomovirus creciendo en fincas tomateras en el distrito de Los Santos.

Hi2: La prevalencia de Begomovirus en las arvenses que crecen en las áreas tomateras del distrito de Los Santos varía entre la temporada de cultivo y la de barbecho.

Ho2: La prevalencia de Begomovirus en las arvenses que crecen en las áreas tomateras del distrito de Los Santos no varía entre la temporada de cultivo y la de barbecho.

Hi3: Las arvenses sintomáticas presentan una prevalencia de infecciones por Begomovirus diferente a la de las plantas asintomáticas.

Ho3: Las arvenses sintomáticas presentan una prevalencia de infecciones por Begomovirus igual a la de las plantas asintomáticas.

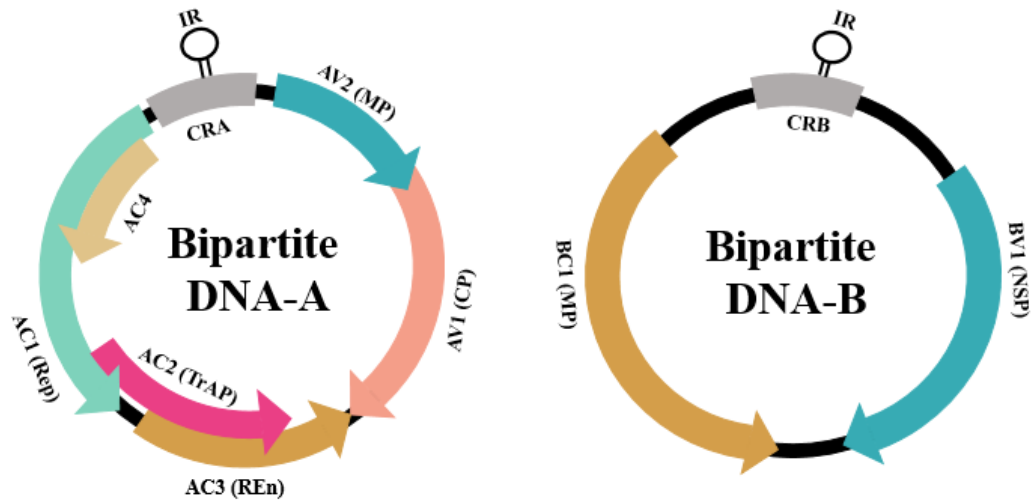
FUNDAMENTACIÓN TEORICA

2.1. Características generales de la familia Geminiviridae

La familia Geminiviridae está conformada por un grupo de virus que infectan plantas con más de 360 especies, cuya partícula viral (virion) vista bajo el microscopio electrónico tiene la forma de dos partículas icosaédricas incompletas parcialmente fusionadas de aproximadamente 2,5-5,2 kb de longitud (Agrios, 2005). Esta morfología de partículas “gemelas” es única dentro de los virus y la principal característica que distingue a esta familia (Krupovic *et al.*, 2009).

Desde el punto de vista molecular, los Geminivirus tienen su genoma contenido en uno o dos componentes de ADN monocatenario (*single stranded DNA* - *ssADN*) circular, encapsulados en partículas separadas. Cada componente tiene secuencias que codifican proteínas tanto en sentido positivo (+) como en sentido negativo (-) es decir, con sentido bidireccional (Agrios, 2005), (figura 1).

Figura 1. Representación del genoma de Geminivirus bipartita (Adaptado de: Hanley-Bowdoin *et al.*, 2000).



El diagrama indica la disposición de los genes del genoma de los Geminivirus. En el sentido de las manecillas del reloj, el componente ADN-A se encuentra compuesta por:

1. MP (sentido positivo), proteína de movimiento con 12.8 kDa
2. CP, proteína de la cápside (sentido positivo) con 29.7 kDa.

En sentido izquierdo o complementario:

3. El gen Rep, proteína de replicación (sentido negativo) con 40.2 kDa.
4. REn, potenciadora de la replicación (sentido negativo) con 15.6 kDa.
5. TrAp, proteína transactivadora (sentido negativo) con 19.6 kDa.
6. C4 (sentido negativo) que puede determinar la expresión de los síntomas con aproximadamente 12.0 kDa de peso.

Por su parte, el Componente ADN-B contiene:

7. NSP, proteína de transporte nuclear (sentido positivo) con 33.1 kDa.
8. MP, proteína de movimiento (sentido negativo) con 29.6 kDa.

La replicación del genoma de los Geminivirus ocurre por medio de un proceso unidireccional en cuyas fases intermedias se sintetiza ADN bicatenario (dsADN). Este proceso se denomina Replicación del Círculo Rodante (Rolling-Circle Replication). El modelo de Replicación del Círculo Rodante requiere de la utilización de la enzima ADN polimerasa del hospedero para llevarse a cabo (Saunders *et al.*, 2001, Krupovic *et al.*, 2009).

2.2. Clasificación taxonómica de la familia Geminiviridae

Económicamente, esta familia es de gran importancia porque incluye, al menos unas 360 especies de virus conocidas capaces de causar elevadas pérdidas económicas a una gran cantidad de cultivos alrededor del mundo (Perring, 2001).

Geminiviridae es actualmente la familia de virus de de ADN monocatenario (*ssADN*) con mayor cantidad de especies descritas (Krupovic, *et al.*, 2009).

Taxonómicamente, la familia *Geminiviridae* se divide en nueve géneros, diferenciados principalmente por la especie de insecto vector (salta-hojas, mosca blanca, áfidos y membrácidos) que lo transmite, rango de hospederos y organización genómica. Su nomenclatura se basa en el uso de un acrónimo de los síntomas que causa la especie viral tipo en el hospedero en el cual se le describe (Fauquet *et al.*, 2003; Varsani *et al.*, 2014) (Cuadro I).

Cuadro I. Clasificación taxonómica actual de la familia Geminiviridae.

GÉNERO	ORGANIZACIÓN GENOMICA	PLANTA HUESPED	VIRUS TIPO	INSECTO VECTOR
Mastrevirus	1 componente (Monopartita) Grupo II (ssADN)	Monocotiledóneas	<i>Maize streak virus</i> (32 especies)	<i>Cicadulina</i> spp. (Hemíptera: Cicadellidae)
Curtovirus	1 componente (Monopartita) Grupo II (ssADN)	Dicotiledóneas	<i>Curly top sugar beat virus</i> (3 especies)	<i>Neoliturus tenellus</i> (= <i>Circulifer tenellus</i>) (Hemíptera: Cicadellidae)
Topocuvirus	1 componente (Monopartita) Grupo II (ssADN)	Dicotiledóneas	<i>Tomato pseudocurly top virus</i> (1 especie)	<i>Micrutalis malleifera</i> (Hemíptera: Membracidae)
Begomovirus	1 o 2 componentes (Monopartita o bipartita) (ssADN o dsADN)	Dicotiledóneas	<i>Bean golden mosaic virus</i> (>360 especies)	<i>Bemisia tabaci</i> (Hemíptera: Aleyrodidae)
Becurtovirus	1 componente (Monopartita) Grupo II (ssADN)	Dicotiledóneas	<i>Beet curly top Iran virus</i> (2 especies reconocidas)	<i>Circulifer haematoceps</i> (Hemíptera: Cicadellidae)
Eragrovirus	1 componente (Monopartita) Grupo II (ssADN)	Dicotiledóneas	<i>Eragrostis curvula virus</i> (1 especie)	Desconocido
Turncurtovirus	1 componente (Monopartita) Grupo II (ssADN)	Dicotiledóneas	<i>Turnip curly top virus</i> (1 especie)	<i>Circulifer haematoceps</i> (Hemíptera: Cicadellidae)
Capulavirus	1 componente (Monopartita) Grupo II (ssADN)	Dicotiledóneas	<i>Euphorbia caput-medusae latent virus</i> (4 especies)	<i>Aphis craccivora</i> (Hemíptera: Aphididae)
Grablovirus	1 componente (Monopartita) Grupo II (ssADN)	Sólo infecta <i>Vitis vinifera</i> (vid).	<i>Grapevine red blotch virus</i> (1 especie)	<i>Spissistilus festinus</i> (Hemíptera: Membracidae)

El grupo más ampliamente diversificado y distribuido es el de los Begomovirus, que es transmitido por el complejo mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) (Sternorrhyncha: Aleyrodidae) a plantas dicotiledóneas (Perring, 2001; Brown *et al.*, 2015).

2.3. El Género Begomovirus

Dentro de la familia *Geminiviridae* se destaca el género Begomovirus el cual cuenta con unas 320 especies reconocidas hasta la fecha. Este género de virus patógenos de dicotiledóneas es responsable de considerables pérdidas económicas en muchas especies de plantas cultivadas alrededor del mundo como son: tomate, frijoles, calabazas, yuca y algodón (Brown *et al.*, 2015).

La especie tipo del género Begomovirus es el *Bean Golden Yellow Mosaic Virus*-BGYMV (Brown *et al.*, 2015) y el género se encuentra tan ampliamente distribuido como su vector, la mosca blanca del tabaco o también llamada mosca blanca del algodón *B. tabaci* (Agrios, 2005; Rosales *et al.*, 2009 y Brown *et al.*, 2015).

Actualmente existen para los Begomovirus dos sistemas de clasificación. Un sistema de clasificación toma en cuenta su origen geográfico y el otro, el tipo de hospedero sobre el cual han evolucionado sus especies miembro. Cada sistema está conformado por dos grupos filogénicos, reflejando su divergencia evolutiva como consecuencia del aislamiento debido a la incapacidad de su vector para volar largas distancias (Acevedo-Rocha *et al.*, 2013; Ilyas *et al.*, 2009 y Trenado *et al.*, 2011).

En el sistema de clasificación con respecto a su distribución geográfica, los Begomovirus se clasifican en los siguientes dos grupos (figura 2):

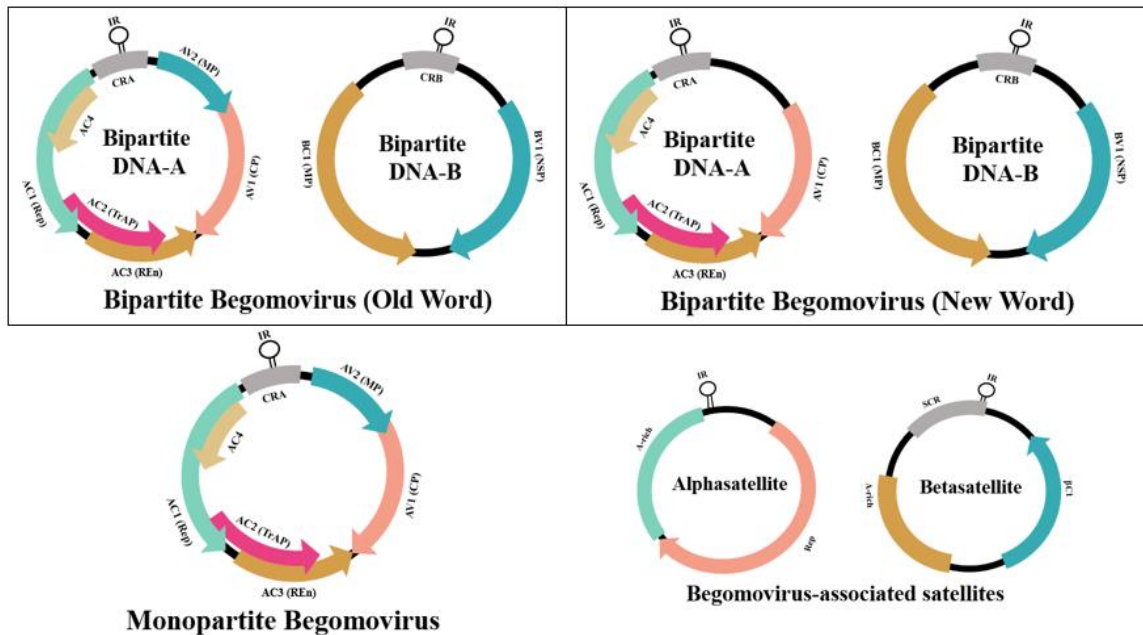
- 1) Begomovirus del Viejo Mundo (OW Begomovirus): virus originarios de Eurasia y África que pueden ser tanto, monopartitos como bipartitos, su genoma contiene el Marco Abierto de Lectura (Open Reading Frame) ORF AV2/V2 y están frecuentemente asociados con alphasatellites y betasatélite. El genoma de cada virión está compuesto de ADN de hebra simple (*ssADN*) de aprox. 2.7 kb.

- 2) Begomovirus del Nuevo Mundo (NW Begomovirus): virus originarios de Latinoamérica y el Caribe. Con la excepción del *Tomato leaf deformation Virus* (ToLDeV) reportado en Perú y Ecuador el genoma de todos estos virus es bipartito (Melgarejo *et al.*, 2013); no contienen el ORF AV2/V2 y pueden asociarse con alphasatellites. Hasta el momento no se ha demostrado su asociación con betasatélites. El genoma de cada virión está compuesto de una sola hebra de ssADN circular de aprox. 2.7 kb.

En el sistema de clasificación con respecto al tipo de hospedero, los dos grupos que existen son:

- 1) Legumovirus: Begomovirus asociados a huéspedes de la familia de las leguminosas (=Fabaceae); su genoma puede ser monopartito o bipartito.
- 2) Sweepovirus: Begomovirus asociados a huéspedes de la familia Convolvulaceae como la batata (*Ipomoea batatas* L.(Lam.)); su genoma puede ser monopartito o bipartito.

Figura 2. Representación esquematizada de los genomas de los principales grupos del género *Begomovirus* (Adaptado de: Nawaz-ul-Rehman & Fauquet, 2009).



2.4. Estructura genómica de los Begomovirus

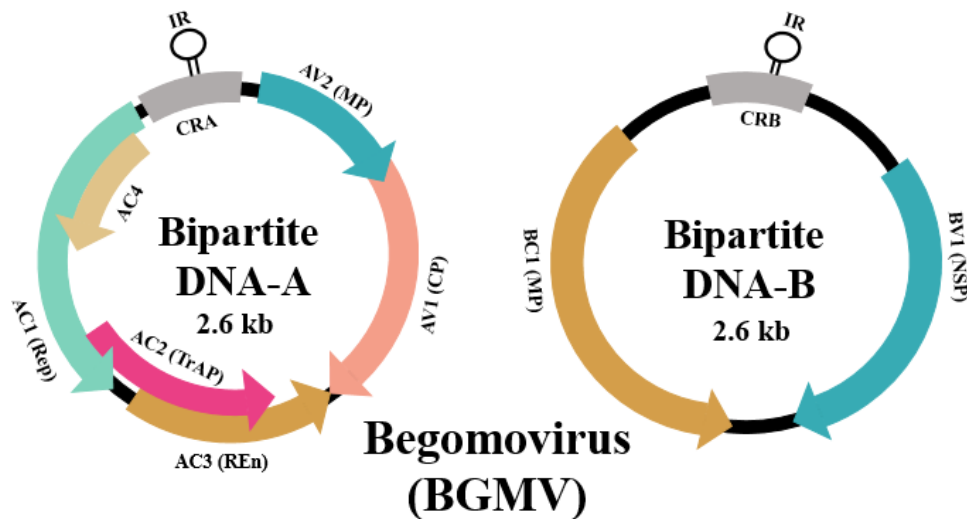
Según Zerbini *et al.*, (2017), los viriones de Begomovirus presentan las siguientes características

- Virión no envuelto.
- Dimensiones: 38 x 22 nm aproximadamente.
- Forma de partículas “gemelas” es decir, conformada por dos partículas icosaedrales parcialmente fusionadas (Típica de la familia *Geminiviridae*).
- Cada partícula contiene una única molécula de ssADN circular.
- Simetría icosaedral T=1 que contiene 22 capsómeros pentaméricos conformados por un arreglo total de 110 proteínas de la cápside (CP).

La mayoría de los Begomovirus tiene genomas bipartitos (Agrios, 2005). Esto quiere decir que el genoma viral se encuentra dividido en dos moléculas de ssADN contenidas en partículas virales separadas también denominadas componentes genómicos de ADN-A y ADN-B (Rojas *et al.*, 2005).

Los viriones gemelos contienen una sola copia de ssADN circular (ADN monocatenario). El tamaño va desde 2.5 a 3.2 kb. Normalmente se requiere de la presencia de ambos segmentos de ADN dentro de una célula huésped para originar una infección sintomática en el hospedero. Por tanto, el tamaño total del genoma es de aproximadamente 5.2 kb (Arnim *et al.*, 1993 y Hamilton *et al.*, 1983) (figura 3).

Figura 3. Tamaño de ambos segmentos de ADN en el genoma de los Begomovirus (Adaptado de: Hanley-Bowdoin *et al.*, 2000).



2.5. Expresión de genes en Begomovirus

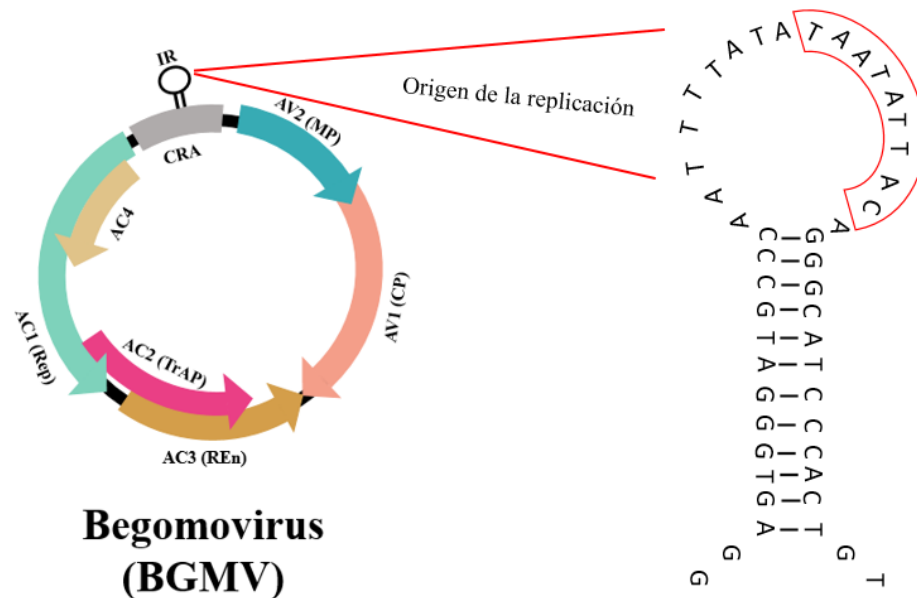
Los genomas de los componentes de ADN-A y ADN-B de un mismo virus, comparten pocas homologías, salvo en el caso de la denominada Región común o región constante (Briddon *et al.*, 2010). La región común se encuentra conformada por una secuencia de aproximadamente 200 nucleótidos, con más de un 85% de concordancia entre los componentes de ADN-A y ADN-B.

La Región Común o constante presenta las siguientes características:

1. Una estructura tipo gancho de pelo (*Hairpin-structure or Stem-loop*).
2. Secuencias repetidas conocidas como Iterones que funcionan como sitios de acople para las proteínas de replicación (*Rep*) en el proceso de Replicación del Círculo Rodante.

Dentro del “lazo” del “hairpin” de la Región constante, se encuentra la secuencia TAATATTAC que actúa como el origen de replicación (*ori*) de la hebra de *ssADN* en el proceso de Replicación del Círculo Rodante (Briddon *et al.*, 2010) (figura 4).

Figura 4. Localización de la secuencia de origen de replicación de los Begomovirus
(Adaptado de: Hanley-Bowdoin *et al.*, 2000).



Es importante mencionar, que los Begomovirus del Nuevo mundo descritos hasta la fecha son todos virus de genoma Bipartitos (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2000; Stanley *et al.*, 2005 y Briddon *et al.*, 2010).

El componente de ADN-B es dependiente para su replicación de la expresión de la información contenida en el componente de ADN-A (Briddon *et al.*, 2010).

2.6. Función de las proteínas

Según Briddon *et al.*, (2010), el componente de ADN-A típicamente codifica de 5 a 6 proteínas incluyendo las proteínas de replicación (Rep), proteínas de la cápside (CP) y otras proteínas cuya función normalmente se relaciona con el transporte, es decir facilitar la

transmisión por medio del vector. El componente ADN-A tiene una función regulatoria necesaria para producir una infección efectiva en el hospedero, aquellas relacionadas con la regulación de la expresión de genes, superar mecanismos de resistencia dentro del hospedero, etc. Estos componentes son homólogos dentro del genoma de todos los Geminivirus (figura 4).

Por su parte, el componente de ADN-B codifica normalmente dos proteínas relacionadas con la movilidad del virus a nivel tanto intra-celular como inter-celular dentro del hospedero. De manera, que su expresión aumenta notablemente la expresión de los síntomas de la infección viral en el hospedero (Briddon *et al.*, 2010).

En el cuadro II, se presentan las regiones genómicas de función de las proteínas de Begomovirus y el tamaño correspondiente para cada una de ellas.

Cuadro II. Proteínas asociadas a la replicación en el genoma de los Begomovirus bipartitas (Lazarowitz *et al.*, 1992; Lazarowitz, 1992; Bisaro, 1996).

Componente	Gen	Sentido de la transcripción	Proteína que codifica	Tamaño de la proteína kiloDalton (kDa)
ADN-A	<i>cp</i>	Viral	Proteína de cubierta	27-30
ADN-A	<i>Rep</i>	Complementario	Replicasa viral	41
ADN-A	<i>TrAP</i>	Complementario	Proteína activadora de la transcripción	15-20
ADN-A	<i>REn</i>	Complementario	Intensificadora de la replicación	14-16
ADN-B	<i>Nsp</i>	Viral	Proteína de movimiento	30-34
ADN-B	<i>Mp</i>	Complementario	Proteína de movimiento	32-34

2.7. Mecanismo de replicación

El proceso de infección en la planta de cultivo inicia con la inoculación del Begomovirus por una Mosca blanca virulenta en el floema (Liu *et al.*, 1997).

En el caso del insecto vector, éste adquiere el virus a través del estilete al alimentarse de una planta enferma y tras un periodo de incubación, aproximadamente 4-8 horas. Una mosca blanca sana que se alimente de una planta infectada por Begomovirus e infectará y el virus se replicará en su hemolinfa (Mehta *et al.*, 1994).

Se sabe también que los Begomovirus son virus de tipo circulativo y persistente que pueden transmitirse a la progenie a través de la madre infectada (Harrison, 1985; Polston y Anderson, 1997).

Una vez dentro de la célula hospedera, la replicación se lleva a cabo dentro del núcleo celular por medio de un proceso conocido como Replicación del Círculo Rodante el cual depende de las enzimas del hospedero para la replicación viral (Saunders *et al.*, 1991).

Durante la Replicación del Círculo Rodante se distinguen dos fases.

Fase I: Inicia con la salida del ADN del virión. La molécula de ADN monocatenario (*ssADN*) que servirá posteriormente como plantilla para la síntesis de una cadena de ADN bicatenario (*dsADN*). Para formar la molécula de *dsADN*, la molécula de *ssADN* formará en la región común (la cual inicia con la secuencia TAATATTAC) una horquilla o lazo de replicación (*hairpin-loop*), a partir del cual, utilizando ADN polimerasa del hospedero se sintetizará la molécula de *dsADN*. Los Geminivirus no codifican enzimas ADN polimerasa. Por esa razón dependen de las enzimas del hospedero, para su replicación (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2000).

Fase II: En esta última fase, la molécula de doble cadena (dsADN) se une a las proteínas histonas. Las otras proteínas celulares se acoplarán con los nucleosomas para formar minicromosomas. A partir de los cuales se transcriben y traducen los genes virales que permiten la infección de más células junto con la replicación de más partículas virales (Saunders *et al.*, 1992).

2.8. Tropismo de la infección por la familia Geminiviridae

El mecanismo de infección de la familia *Geminiviridae* se inicia al penetrar el virus en la célula huésped, células diferenciadas que se encuentren en su fase G, es decir cuando éstas han terminado la mayoría de sus actividades de replicación de ADN. Al transcurrir los procesos de replicación del genoma y traducción de las proteínas se inicia la movilización de la infección dentro del huésped (Nagar, 2002). Comúnmente el género Begomovirus se limita al floema y están restringidos al sistema vascular (Morra & Petty, 2000).

La capacidad de los virus de invadir los tejidos del huésped y diseminar una infección sistémica es esencial para que complete el ciclo de la enfermedad. Dependiendo del tipo de célula y los tejidos infectados se conoce lo que define el tropismo de la infección (Nagar, 2002).

2.9. Epidemiología de los Begomovirus

Con respecto a la transmisión de los Geminivirus por las moscas blancas de la especie *B. tabaci* a las plantas hospederas, Duffus (1987) indica las siguientes características:

1. *B. tabaci* transmite los Begomovirus de manera persistente y circulativa.

2. Al adquirir el virus, será capaz de infectar plantas sanas generalmente hasta su muerte.
3. Para que una mosca blanca se convierta en un vector activo para un Geminivirus, requiere de un período mínimo de una hora de alimentación continua en un hospedero infectado.

Autores como Haider & Tahir, (2004) reportan, que es posible transmitir el *Solanum Yellow leaf curl virus* (Geminiviridae: Begomovirus) que infecta a la arvense *Solanum nigrum*, por medio de injerto a plantas de tomate (*S. lycopersicum*) y a arvenses de las especies *Nicotiana benthamiana* y *Datura stramonium*.

Los síntomas, observados tanto en cultivos como en arvenses, suelen consistir en encrespamiento de la hoja, mosaico amarillo, coloración amarillenta de la vena, amarillamiento de las hojas, frecuentemente acompañados por retraso en el crecimiento de la planta (Agrios, 2005).

Según los trabajos de autores como Castillo-Urquiza *et al.*, (2008) y Varsani *et al.*, (2014); las nuevas especies de Begomovirus descritos inicialmente atacando arvenses, han sido posteriormente reportados infectando plantas cultivadas.

2.10. Arvenses como hospedero de Begomovirus

Las malezas como hospederos alternos de virus juegan un papel muy importante en la epidemiología viral (Maelzer, 1986).

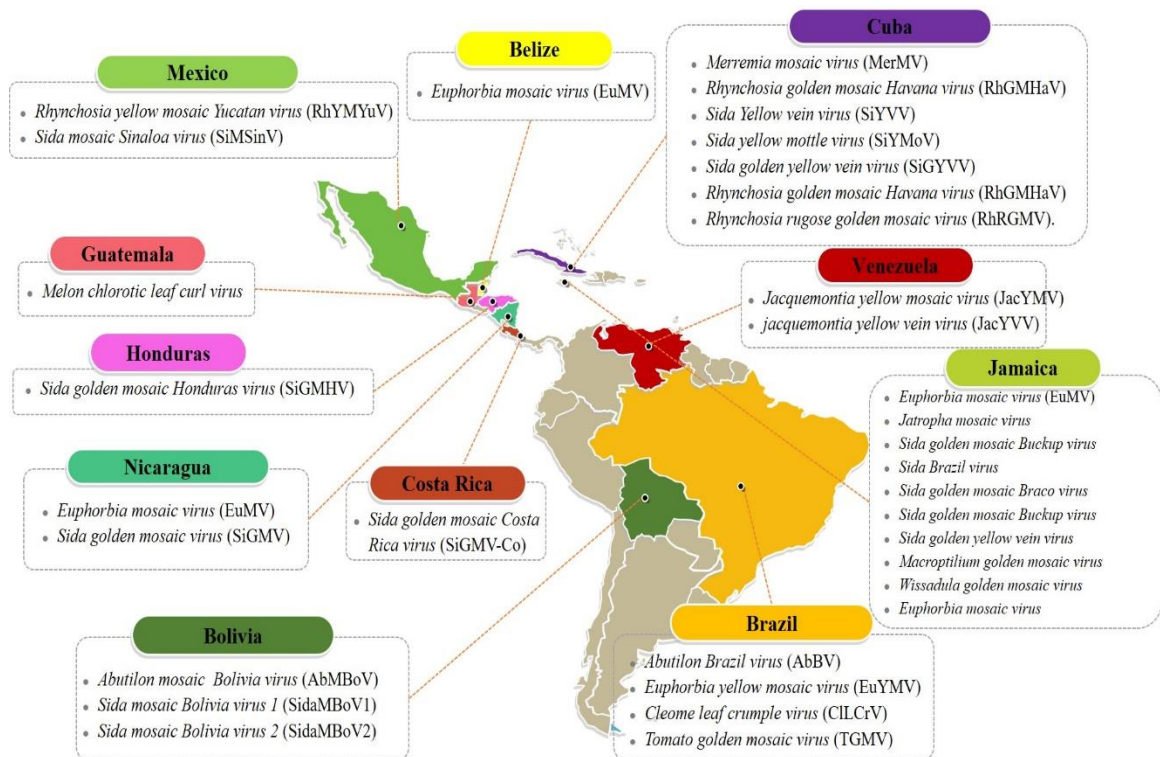
Según diversos investigadores, las arvenses se han convertido en el sitio ideal para que virus del género de Begomovirus puedan sobrevivir durante décadas a falta de cultivos, permitiendo la conservación de la estructura genética o participando en procesos de intercambio genético tales como recombinación con o sin pseudorecombinación, lo que

puede estar contribuyendo a la aparición de nuevas enfermedades virales (Padidam *et al.*, 1999; Ramos *et al.*, 2003; Jovel *et al.*, 2004; García-Andrés *et al.*, 2006).

2.11. Distribución y diversidad de Begomovirus en arvenses para Latinoamérica

Existen varios casos de infecciones por Begomovirus reportados como patógenos en arvenses que han sido detectados causando daños en plantas cultivadas (anexo 5) (figura 5).

Figura 5. Mapa representativo de la distribución geográfica en Latinoamérica y el Caribe con reportes de arvenses positivas a infección viral por Begomovirus (Fuente: La autora, 2018).



Otros casos reportados han sido de Begomovirus detectados primero en arvenses y posteriormente en infecciones naturales en plantas cultivadas. Algunos de ellos son *Tomato yellow leaf curl Axarquia virus* en tomate (García-Andrés *et al.*, 2006), *Calopogonium Golden mosaic virus* en frijol (Díaz *et al.*, 2002, Karkashian *et al.*, 2011), *Sida golden mosaic virus* (SiGMV) en frijol (Fiallo-Olivé *et al.*, 2012), *Merremia mosaic virus* en pimiento picante y pimiento dulce, *Euphorbia mosaic virus*-[Yucatan Peninsula]” en pimiento picante (McLaughlin *et al.*, 2008), *Sida micrantha mosaic virus* en Soya, (Fernandes *et al.*, 2009).

Por otro lado, Salati *et al.*, (2002) demostraron que plantas arvenses asintomáticas de las especies: *Cleome viscosa* (Cleomaceae=Caparaceae), *Croton lobatus* (Euphorbiaceae), *Malva* spp. (Malvaceae), *Solanum nigrum* (Solanaceae) y *Physalis* spp. (Solanaceae) que crecían en los campos durante la época de barbecho o en los alrededores de estos, servían como reservorios de Begomovirus para los cultivos de especies dicotiledóneas que se plantarían posteriormente en las áreas aledañas.

De manera opuesta, también se han reportado Begomovirus de plantas cultivadas en arvenses, como *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) en *Nicandra physaloides* (Solanaceae) (Barreto *et al.*, 2013).

2.12. Arvenses con Begomovirus en Panamá

Las investigaciones efectuadas en Panamá han sido orientadas en la detección de Begomovirus en plantas de tomate (*S. lycopersicum*) asociados a la presencia de *B. tabaci* (Engel *et al.*, 1998).

Sin embargo, autores como Fernández *et al.*, (1998) contemplaron el posible papel de las arvenses como hospederos de Geminivirus, reportándose así, siete especies de plantas arvenses con infección, dentro de las cuales, dominaban las correspondientes a la familia

de las Malvaceae (*Herissantia crispa* L. Brizicky, *Sida acuta* Burm.f., *Sida rhombifolia* L.), Euphorbiaceae (*Euphorbia heterophylla* L.) y otras dentro de las familias Tiliaceae (*Corchorus orinocensis* Kunth), Fabaceae (*Rhynchosia minima* L.) y Asteraceae (*Eleutheranthera ruderalis* Sw. Sch.Bip.).

2.13. Detección e identificación de la familia Geminiviridae

La identificación de las familias de virus ha incluido una gran variedad de técnicas. Inicialmente se utilizaban ensayos en donde se valoraba la expresión y los síntomas mediante la transmisión a plantas indicadoras a través del vector (Harrison, 1985). Los ensayos requieren de intervalos de tiempo largos para conocer los resultados, adicionalmente, la valoración de los síntomas en las plantas indicadoras puede ser confundido con deficiencias nutricionales e inclusive con la sintomatología de otra familia viral. También, la visualización de los cuerpos de inclusión con la utilización del microscopio óptico contribuyó con la localización de los viriones en las células vegetales para su posterior observación con la ayuda de la microscopía electrónica (Bock & Guthrie, 1978). Sin embargo, estos resultados pueden ser poco precisos debido a la semejanza dentro de la familia en estudio.

En la actualidad, aunque los métodos convencionales se siguen utilizando, han sido reemplazados por técnicas de detección específicas. Las nuevas técnicas, como la hibridación molecular y la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR), consideran las variaciones en diferentes combinaciones virus-hospedero entre familias de Geminivirus (Brown & Bird, 1992; Hilje, 1996). Así como también la variación genética del ADN y características del ácido nucleico, morfología de la partícula y forma de replicación para su identificación (Matthews, 1982).

2.14. Detección por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La técnica conocida como Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), desarrollada por el bioquímico Kary Mullis en 1986, consiste en replicar un fragmento de ADN generando un gran número de copias a partir de una única; estas copias son tan abundantes, siendo suficientes para ser detectadas, identificadas y estudiadas por otras herramientas moleculares (Agrios, 2005).

La técnica de PCR se fundamenta en la propiedad natural de la enzima ADN polimerasa para replicar hebras de ADN. Este proceso se realiza de forma automatizada, mediante un Termociclador que realiza los 20-40 ciclos de amplificación que incluye variaciones de temperaturas (Rychlik *et al.*, 1990).

Fases del ciclo de replicación del ADN en un termociclador:

1. Desnaturalización: se realiza a temperaturas entre 92-97 °C. Separa las hebras de ADN doble cadena.
2. Alineamiento o unión del cebador: se realiza a temperaturas entre 55-65°C. La reacción se enfría para que los cebadores puedan unirse a sus secuencias complementarias.
3. Extensión o elongación de la cadena: se realiza a temperaturas de 72°C. La temperatura de la reacción se eleva para que la Taq polimerasa extienda los cebadores y sintetice así nuevas cadenas de ADN.

Este método ha incrementado la eficiencia de la detección de las variaciones genéticas a nivel de ADN, presentando en comparación con métodos menos modernos, una serie de ventajas que favorecen su uso en biología molecular. Entre ellos se pueden mencionar

(Garibyan & Avashia, 2013): Se obtienen resultados con mayor rapidez, utiliza pequeñas cantidades de ADN (nanogramos, picogramos), el ADN obtenido es muy puro.

Sin embargo, presentan algunos inconvenientes al momento de su implementación, siendo así que la síntesis del cebador requiere conocer la secuencia de ADN que flanquean al investigado y debido a su alta sensibilidad, es muy susceptible a la contaminación en el laboratorio (Garibyan & Avashia, 2013).

ASPECTOS METODOLÓGICOS

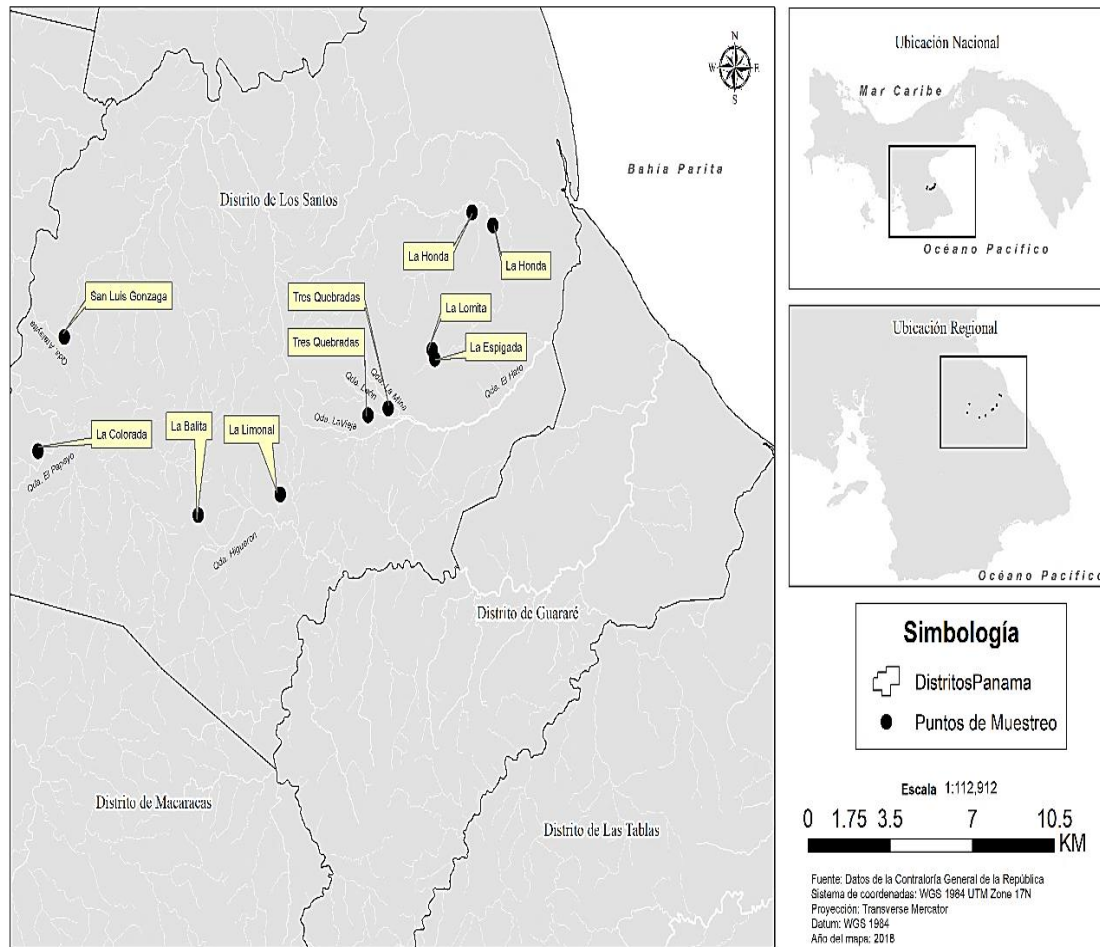
3.1. Área de estudio

El área de trabajo es en el Distrito de Los Santos, Provincia de Los Santos, donde se da la mayor producción de tomate industrial y de mesa. En esta área se siembra el 80% del total para la provincia (Departamento de Planificación del Ministerio de Desarrollo Agropecuario-MIDA-2014).

Se seleccionaron diez fincas pertenecientes a los productores dedicados al cultivo de tomate industrial, asociados a la Cooperativa El Progreso R.L. del Corregimiento de Agua Buena del Distrito de Los Santos con altitudes de entre los 26 y 28 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.) (cuadro III).

Las fincas se encuentran ubicadas en los corregimientos Tres Quebradas, La Limona, La Colorada, San Luis, La Balita, La Espigadilla, La Lomita y La Honda en el distrito de Los Santos (figura 6).

Figura 6. Ubicación geográfica de las fincas de tomate industrial muestreadas en el distrito de Los Santos durante la temporada 2016-2017 (Fuente: La autora, 2018).



Se realizó un registro de todas las unidades de producción visitadas que incluyó: la ubicación geográfica usando un sistema de posicionamiento global (GPS) (Etrex, Summit HC, Garmin®, Shijr, Taiwan), cultivar de tomate y fecha de muestreo (figura 6).

Las fincas seleccionadas tenían dos temporadas dentro del manejo que le dan los agricultores de la zona a sus campos de cultivo. Una temporada con cultivo, que coincide con la época seca durante los meses de octubre hasta abril. La siembra se realiza durante la época seca con la finalidad de escapar de las enfermedades y por los requerimientos

climáticos del cultivo de tomate industrial. Y la otra temporada correspondiente con la de barbecho, la cual se realiza durante la época lluviosa en los meses de mayo a septiembre. Durante este lapso, el agricultor le permite al suelo recuperarse de la actividad agrícola reciente.

Cuadro III. Registro de las áreas de producción de tomate industrial muestreadas durante la temporada 2016-2017.

No. Finca	Pueblo	Provincia	Época de muestreo	Fecha colecta	Coordenadas (WGS 84)	
					Latitud	Longitud
1	Tres Quebradas	Los Santos	Cultivo	Descanso	15/02/16;	N W
					29/08/16	7°50'51.4176" 80°23'37.8605"
2	Tres Quebradas	Los Santos	Cultivo	Descanso	15/02/16;	N W
					29/08/16	7°50'44.4912" 80°24'05.9858"
3	La Limona	Los Santos	Cultivo	Descanso	16/02/16;	N W
					29/08/16	7°49'24.9456" 80°26'07.9588"
4	La Colorada	Los Santos	Cultivo	Descanso	17/02/16;	N W
					29/08/16	7°50'09.0924" 80°31'45.3774"
5	San Luis Gonzaga	Los Santos	Cultivo	Descanso	17/02/16;	N 7°51'44.2" W 80°30'60"
					29/08/16	
6	La Balita	Los Santos	Cultivo	Descanso	18/03/16;	N 7°49'400" W 80°28'281'
					29/08/16	
7	La Espigadilla	Los Santos	Cultivo		16/03/17	N 7°51'41" W 80°22'33"
8	La Lomita	Los Santos	Cultivo		16/03/17	N 7°51'51" W 80°22'37"
9	La Honda	Los Santos	Cultivo		16/03/17	N 7°53'56" W 80°21'12"
10	La Honda	Los Santos	Cultivo		16/03/17	N 7°54'14" W 80°21'67"

3.1.1. Clima

El clima se describe como una zona tropical de sabana (Aw) con temperatura mínima de 20°C y máximas de 35°C, y precipitación anual de 1053 milímetros representativo del Arco Seco de Azuero (ETESA, 2015). En la época lluviosa, se muestran periodos de sequía hasta de 20 días.

3.2. Colecta de arvenses

3.2.1. Densidad de arvenses en las parcelas

La distribución de las poblaciones de arvenses en las parcelas dedicadas al cultivo de tomate (*S. lycopersicum*) no era homogénea sino en parches (Heijting *et al.*, 2007) (anexo 1).

Por tanto, no se tomó un número de puntos de evaluación dentro de las parcelas (Tenjo & Alejandro, 2013), se realizó un muestreo dirigido (Hernández *et al.*, 2014) tomando en cuenta tres criterios: arvenses reportadas previamente como hospederas de Begomovirus, arvenses con síntomas de virosis, arvenses asintomáticas, debido a que como menciona Ormeño *et al.*, (2003) pueden existir plantas hospederas de virosis en ambas categorías.

3.2.2. Colecta de muestras para detección de Begomovirus

Los muestreos se realizaron en dos ocasiones, en las diez (10) fincas dedicadas al cultivo de tomate industrial en el distrito de Los Santos. La primera ocasión se realizó durante la temporada de cultivo durante los meses de octubre a abril de 2016 y 2017. La segunda ocasión se realizó en temporada de barbecho durante los meses de mayo a septiembre de 2016. En cada visita, se colectaron de uno a cinco (1-5) folíolos apicales de plantas dicotiledóneas de especies con o sin síntomas de infección por Begomovirus.

Las parcelas se recorrieron a pie tratando de abarcar una superficie representativa de la misma. Durante este recorrido, se colectaron ciento catorce (114) muestras de follaje y ápices de las arvenses dicotiledóneas tanto sintomáticas como asintomáticas. Se consideró como plantas sintomáticas aquellas con la presencia de síntomas característicos de virosis, tales como: mosaico foliar amarillo, moteado foliar amarillo, entrenudos cortos, hojas enrolladas o rizadas (anexo 2). Las plantas que no presentaban ninguno de estos síntomas se clasificaron como asintomáticas (anexo 3).

3.3. Conservación de las muestras

Las muestras colectadas en campo se colocaron en tubos de poliuretano de 50 ml con sílica gel (Scharlau ®, Barcelona, España) como secante para garantizar su conservación. El manejo consistió en cambiar diariamente el secante de las muestras para asegurar la deshidratación y constatar que las mismas no presentaran crecimientos de hongos.

Posteriormente, fueron trasladadas al Laboratorio de Biología Molecular en la Universidad de Panamá, Facultad de Ciencias Agropecuarias, provincia de Chiriquí en donde se realizó la extracción del ADN total mediante el protocolo de Dellaporta (Dellaporta *et al.*, 1983) modificado (figura 5).

3.4. Identificación taxonómica de arvenses colectadas

La identificación preliminar de un total de 114 arvenses se realizó en campo, mediante observación de las plantas con flores y frutos con la participación del Ing. Orlando Osorio MSc del Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP).

Se colectaron al azar, un mínimo de tres plantas completas de cada especie, de preferencia con flores y frutos. En algunos casos se colectaron plantas adultas que no contaban con estos órganos por no coincidir su ciclo reproductivo con el cultivo del tomate.

Las plantas se ubicaban dentro y en el contorno de las parcelas de tomate. Estas se colocaron en bolsas plásticas y se mantuvieron con hielo (4 °C) hasta llegar al laboratorio, donde se colocaron sobre papel periódico y fueron debidamente registradas. Las muestras colectadas, una vez codificadas fueron identificadas en el laboratorio del IDIAP. Posteriormente fueron confirmadas en el Herbario de la Universidad Autónoma de Chiriquí (UNACHI) (cuadro VII).

3.5. Análisis estadístico

Como criterio de decisión para aceptar o rechazar las hipótesis formuladas se utilizó una Prueba de t de Student con un nivel de significancia no mayor al 5% para verificar que las diferencias entre las medias no se debieron al azar.

El proceso de selección de las muestras de tejido vegetal en campo se realizó de manera aleatorizada y los valores de las prevalencias de las plantas infectadas por Begomovirus fueron transformadas con $\sqrt{x} + 2$ para compensar la falta de normalidad de los datos.

3.6. Variables

En esta investigación la variable de estudio fue la prevalencia de plantas infectadas por Begomovirus.

Se consideró infectada por Begomovirus aquellas plantas en las que se demostró por medio de Electroforesis la presencia de ADN viral amplificado por medio de PCR a partir de cebadores degenerados específicos AVCORE 494 y ACCORE 1048 para este tipo de virus.

Como parámetro para estimar la significancia de las bandas positivas, se utilizó la prueba de t de Student para determinar los valores promedio de la prevalencia de muestras infectadas por Begomovirus, con este mismo parámetro se evaluó la prevalencia entre temporada de barbecho y temporada de cultivo. La misma comparación se utilizó para estimar la significancia de bandas positivas entre muestras sintomáticas y asintomáticas.

3.7. Método de diagnóstico

3.7.1. Extracción de ADN total por el método de Dellaporta modificado

Se obtuvo el ADN total a partir de 0.05 gramos de tejido vegetal. La extracción de los ácidos nucleicos totales se realizó siguiendo el protocolo de Dellaporta modificado (Dellaporta *et al.*, 1983), (anexo 7). Se utilizaron los siguientes reactivos para preparar el amortiguador de extracción (cuadro IV).

Cuadro IV. Soluciones requeridas para preparar 1 Litro (L) del amortiguador de extracción de Dellaporta (Dellaporta *et al.*, 1983).

SOLUCIÓN	CANTIDAD
EDTA 0.5 M pH 8.0	500 mL
Tris HCl 1 M (tris-hidroximetil amino etano) pH 8.0	150 mL
NaCl 4 M	200 mL
SDS (sodio-dodecil sulfato) 10%.	100 mL
KCH₃COO 5 M con pH 5.5	100 mL
BME (Beta mercaptoethanol)	700 µL/L

El amortiguador de extracción se almacenó sin agregar el Beta mercaptoethanol (BME). Este reactivo se agregó de acuerdo con la cantidad de muestras procesadas por día.

El producto obtenido al final del proceso de extracción fue resuspendido en 100 microlitros (µL) de agua bidestilada estéril, sellado con papel Parafilm® y conservado a -20 °C hasta su posterior uso.

Al finalizar la extracción del ADN vegetal, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.0% en solución TAE IX (Tris, Ácido acético y EDTA) (anexo 8). Las lecturas de las bandas originadas, en el gel de agarosa 1.0%, se llevaron a cabo utilizando un transiluminador UV (Ultra Lum Inc., Carson, California) para determinar visualmente, a través de la intensidad lumínica, la calidad del ADN total y realizar extracciones nuevamente a aquellas muestras que no presentaban una luminiscencia satisfactoria.

3.7.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y electroforesis en gel de agarosa 1.5%

El ADN total de ciento catorce (114) muestras se analizó utilizando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

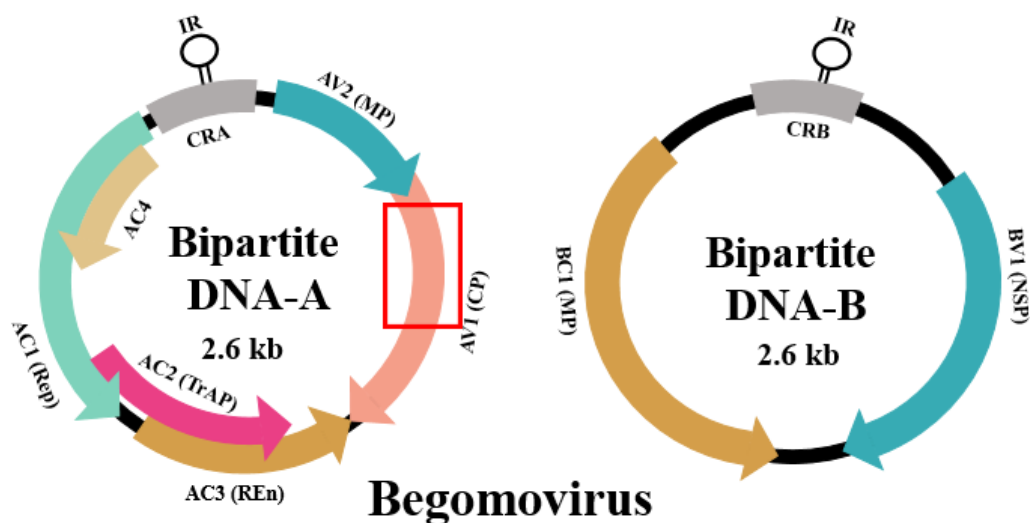
Se amplificó un fragmento del ADN viral mediante los cebadores degenerados AVCORE 494 y ACCORE 1048 que amplifican una región conservada de aproximadamente 550 pares de bases (pb) ubicada en la parte central de la secuencia de ADN que codifica la proteína de la cápside de los Begomovirus (Wyatt & Brown, 1996) (cuadro V), (figura 7).

Para la detección molecular se utilizó como control positivo una muestra de *Rhynchosia minima* (L.) DC. infectada con Begomovirus. Como control negativo, ADN extraído de tejido vegetal sano de plantas de tomate germinadas en condiciones controladas, recolectadas a los 5 días después de germinadas.

Cuadro V. Secuencias de nucleótidos de los cebadores degenerados utilizados para amplificar el ADN viral.

Nombre del cebador	Secuencia	Región que amplifica	Tm
ACCORE	5'GGRTTDGARGCATGHGTACANGCC 3'	Proteína de cubierta	66.6°C
AVCORE	5'GCCHATRTAYAGRAAGCCMAGRAT 3'	Proteína de cubierta	62.6 °C
Nucleótidos degenerados: R = A/G; Y = C/T; M = A/C; K = G/T; W = A/T; S = C/G; B = C/G/T; D = A/G/T; H = A/C/T; V = A/C/G; N = A/C/G/T			

Figura 7. Ubicación de la región conservada de 550 pares de bases (pb) de manera específica en el género Begomovirus (Adaptado de: Hanley-Bowdoin *et al.*, 2000).



La amplificación mediante PCR se realizó en un termociclador de 96 pocillos modelo 2720 Applied Biosystems Thermal Cycler versión 2.09 (ThermoFisher Scientific, CA, U.S.A). El programa de PCR consistió en 2 minutos a 94 °C, 30 ciclos que comprendían tres etapas cada uno: 94 °C durante 1 min, 58 °C durante 1 min y 72 °C por 1 min.

La composición de la mezcla para la PCR fue optimizada para amplificar plantillas de ADN en el intervalo de 0.2 – 2.0 Kb. Se utilizó PCR Master Mix® (Promega® Madison WI, U.S.A) consistente en una solución premezclada que contiene 50 unidades/mililitro de *Taq* ADN polimerasa en solución amortiguadora (pH 8.5), dNTP's (400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP, 400 µM dTTP, 3mM MgCl₂ en concentraciones óptimas que garantizan la amplificación del ADN.

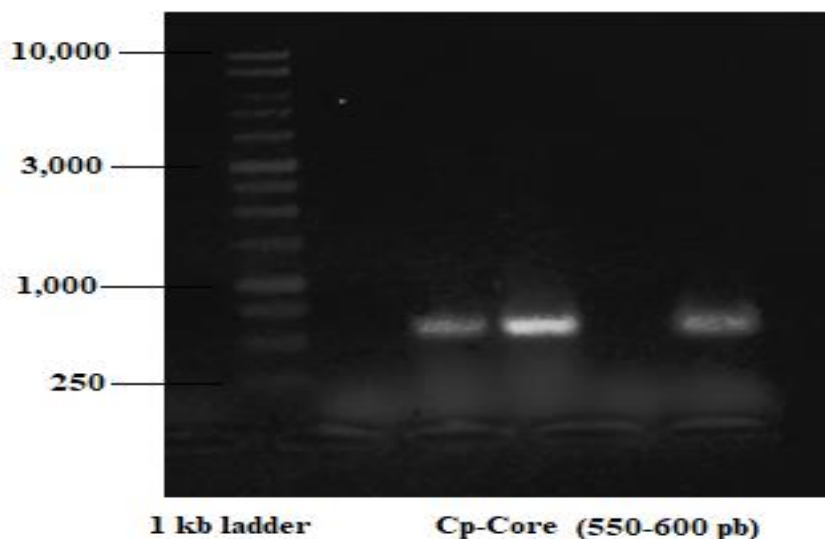
Se preparó una solución con volumen de reacción final de 12.5 µL; del cual 10 µL correspondieron al mix de PCR y 2.5 µL de ADN viral. La solución de PCR consistió en 6.25 µL de PCR Master Mix® (Promega®, Madison WI, U.S.A), 0.50 µL de cada cebador AVCORE 494 y ACCORE 1048 con 2.25 µL de agua destilada estéril.

Finalizada la reacción de PCR se tomaron alícuotas de 10 μ L de los productos de la amplificación para su visualización mediante corridas electroforéticas en gel de agarosa al 1.5%.

A la alícuota se le adicionó 2 μ L de tinte Blue/Orange 6X Loading dye (Promega®, Madison WI, U.S.A) y se colocó, según el orden preestablecido, en los pocillos del gel de agarosa 1.5%. También se colocó 2 μ L del marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (Promega®, Madison WI, U.S.A) como patrón para determinar el tamaño del fragmento amplificado (figura 8).

Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa (Type I, Sigma-Aldrich, Germany) al 1.5% en tampón TAE 1X (Tris, Ácido acético y EDTA), teñido con bromuro de etidio (Promega®, Madison, WI, U.S.A.).

Figura 8. Peso molecular de muestras positivas a Begomovirus y marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (Promega®, WI, Madison, U.S.A.) en gel de agarosa 1.5% (Fuente: La autora, 2018).



La observación de una banda de entre 550 y 600 pares de bases confirmó la presencia de Begomovirus en las muestras como señalan Wyatt and Brown (1996), (figura 9).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Identificación taxonómica de las arvenses asociadas al cultivo de tomate (*S. lycopersicum*) industrial en el distrito de Los Santos.

Las arvenses colectadas se encontraban distribuidas en forma irregular. La proporción de las arvenses en las fincas visitadas tuvo mucha variabilidad, por lo que se observaban áreas con elevada densidad de una especie y otras con niveles bajos o nulos. Sin embargo, se colectaron aquellas que presentaron las características definidas previamente en el muestreo.

En el cuadro VI se presentan los resultados de las identificaciones de las arvenses asociadas al cultivo de tomate.

Cuadro VI. Identificación taxonómica de las arvenses asociadas al cultivo de tomate (*S. lycopersicum*) presentes en las fincas ubicadas en el distrito de Los Santos.

No.	Nombre científico	Cantidad colectada	Nombre común	Familia
1	<i>Abutilon</i> sp.	1	Malva	Malvaceae
2	<i>Amaranthus dubius</i> Mart. ex Thell.	1	Bledo	Amaranthaceae
3	<i>Amaranthus spinosus</i> (L.)	4	Bledo	Amaranthaceae
4	<i>Bactocytia unguis</i> (L.) Mart.	1	Uña de gato	Bignoniaceae
5	<i>Borreria laevis</i> (Lam.) Griseb.	1	Botoncillo	Rubiaceae
6	<i>Calopogonium mucunoides</i> Desv.	9	Frijolillo	Fabaceae
7	<i>Cleome viscosa</i> (L.)	5	Barba de chivo	Cleomaceae
8	<i>Corchorus orinocensis</i> Kunth	2	Balsilla	Tiliaceae
9	<i>Croton hirtus</i> L'Hér.	1	Croton	Euphorbiaceae
10	<i>Cucumis melo</i> (L.)	2	Meloncillo	Cucurbitaceae
11	<i>Desmodium tortuosum</i> Desv.	2	Pega pega	Fabaceae
12	<i>Eleutheranthera ruderalis</i> (Sw.) Sch.Bip.	2	Ogiera	Asteraceae
13	<i>Euphorbia heterophylla</i> (L.)	7	Palito de leche	Euphorbiaceae
14	<i>Euphorbia hypericifolia</i> (L.)	2	Palito de leche	Euphorbiaceae
15	<i>Euphorbia</i> spp.	1	Palito de leche	Euphorbiaceae
16	<i>Heliotropium indicum</i> (L.)	3	Cola de alacrán	Boraginaceae
17	<i>Hybanthus attenuatus</i> Humb. & Bonpl. ex Roem. & Schult.	2	Falsa Spigellia	Violaceae
18	<i>Jatropha gossypifolia</i> (L.)	2	Frailecillo	Euphorbiaceae
19	<i>Jatropha integerrima</i> Jacq.	1	Peregrina	Euphorbiaceae
20	<i>Kallstroemia maxima</i> Scop.	3	Verdolaga de abrojo	Zygophyllaceae
21	<i>Ludwigia</i> sp.	2	Clavito	Onagraceae
22	<i>Malachra alceifolia</i> Jacq.	7	Malva	Malvaceae
23	<i>Malvastrum americanum</i> (L.) Torr	4	Taparabo	Malvaceae
24	<i>Melampodium divaricatum</i> (L. C. Rich.) DC.	1	Botón de oro	Asteraceae
25	<i>Melochia pyramidata</i> (L.)	1	Malva común	Sterculiaceae
26	<i>Melochia</i> sp.	1	Escobilla	Sterculiaceae
27	<i>Mimosa</i> sp.	1	Dormidera	Fabaceae
28	<i>Momordica charantia</i> (L.)	1	Cundeamor, pepinillo	Cucurbitaceae
29	<i>Phyllanthus amarus</i> Schum. & Thonn.	2	Flor escondida, Balsilla	Phyllanthaceae
30	<i>Physalis angulata</i> (L.)	6	Topeton, Mullaca	Solanaceae

Continuación del cuadro VI

No.	Nombre científico	Cantidad colectada	Nombre común	Familia
31	<i>Portulaca oleraceae</i> (L.)	4	Verdolaga	Portulacaceae
32	<i>Rhynchosia minima</i> (L.) DC.	20	Frijolillo	Fabaceae
33	<i>Richardia scabra</i> (L.)	1	Tabaquillo	Rubiaceae
34	<i>Sida acuta</i> Burm.f.	3	Escoba	Malvaceae
35	<i>Sida</i> spp.	1	Escoba	Malvaceae
36	<i>Spiracantha cornifolia</i> Kunth	1	Pega pega	Asteraceae
37	<i>Tridax procumbens</i> (L.)	1	Cadillo	Asteraceae

Los resultados de las identificaciones efectuadas indican que las arvenses más predominantes colectadas durante la época de barbecho y cultivo incluyeron un total de treinta y siete (37) especies pertenecientes a dieciocho (18) familias.

Dentro de las dieciocho (18) familias, se obtuvo que ocho (8) de ellas se encontraban con mayor frecuencia distribuidas en las fincas muestreadas. Tales familias fueron: Fabaceae, que abarcó un total de treinta y dos (32) muestras representadas por *C. muconoides*, *D. tortuosum*, *Mimosa* sp. y *R. minima*; Malvaceae con dieciséis (16) muestras representadas por *Abutilon* sp., *M. alceifolia*, *M. americanum*, *S. acuta* y *Sida* spp; Euphorbiaceae con quince (15) muestras representadas por *C. hirtus*, *Euphorbia* spp., *E. heterophylla*, *E. hypericifolia*, *J. gossypifolia* y *J. integrifolia*. En menores cantidades, las familias: Solanaceae obtuvo seis (6) muestras representada por *P. angulata*; Cleomaceae con cinco (5) muestras de *C. viscosa*; la familia Amaranthaceae con cinco (5) muestras representada por las especies *A. dubius*, *A. spinosus*. Las Asteraceae con cinco (5) muestras provenientes de las especies *E. ruderalis*, *M. divaricatum*, *S. cornifolia* y *T. procumbens* y la familia Portulacaceae con cinco (5) muestras de *P. oleraceae* (anexo 10).

Las familias y especies mencionadas fueron las que se presentaron de manera constante durante las épocas de cultivo y barbecho en las fincas muestreadas.

4.2 Detección de Begomovirus en arvenses asociadas al cultivo de tomate industrial mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

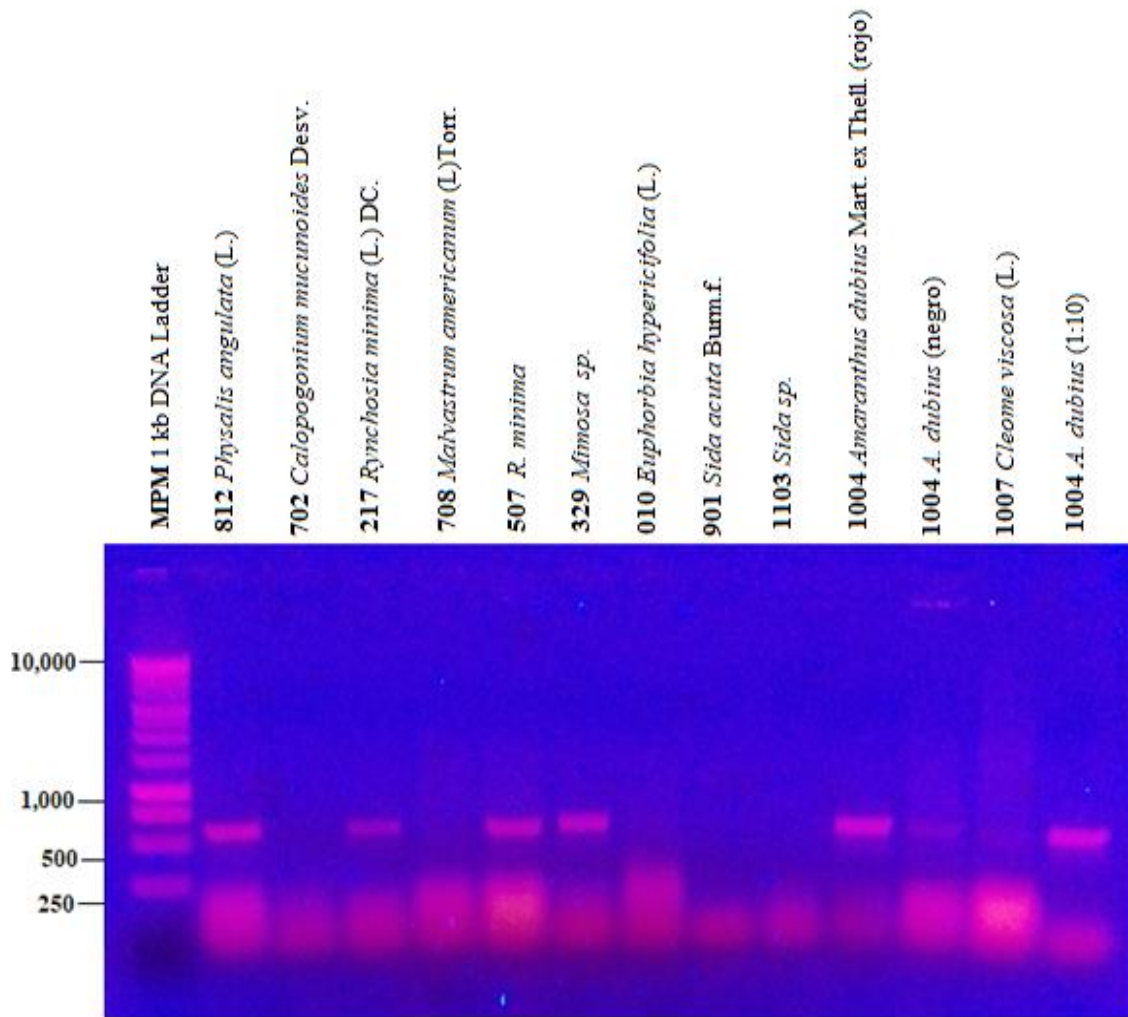
La utilización de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de Begomovirus en malezas asociadas al cultivo de tomate (*S. lycopersicum*) se llevó a cabo con éxito en 110 muestras colectadas (anexo 10).

En el cuadro X de resultado de las especies de arvenses analizadas mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) no se incluyen aquellas muestras que fueron categorizadas como dudosas, debido a que la fluorescencia de las bandas de entre 550 y 600 pares de bases que indican la presencia de Begomovirus como señalan Wyatt and Brown (1996) no se presentaban bien definidas. Tales muestras se mencionan a continuación:

- *Jatropha gossypifolia* (L.). Número de muestra 1328
- *Cucumis melo* (L.). Número de muestra 1513
- *Bactocidia unguis* (L.) Mart. Número de muestra 1604
- *Malachra alceifolia* Jacq. Número de muestra 1611.

En la figura 9 se presentan los resultados de las amplificaciones de ADN de Begomovirus en un grupo de arvenses diagnosticadas como positivas o negativas según la fluorescencia de las bandas como señalan Wyatt and Brown (1996).

Figura 9. Resultado de la amplificación de ADN de Begomovirus en muestras de arvenses asociadas al cultivo de tomate industrial en el distrito de Los Santos. De izq a derecha. Carril MPM, marcador de peso molecular 1 Kb Ladder (Promega®, WI, Madison, U.S.A.); 812, *Physalis angulata* (L.); 702, *Calopogonium mucunoides* Desv.; 217, *Rhynchosia minima* (L.) DC.; 708, *Malvastrum americanum* (L.) Torr.; 507, *R. minima*; 329, *Mimosa* sp.; 010, *Euphorbia hypericifolia* (L.); 901, *Sida acuta* Burm. f.; 1103, *Sida* sp.; 1004, *Amaranthus dubius* Mart. ex Thell. (rojo); 1004, *A. dubius* (negro); 1007 *Cleome viscosa* (L.); 1004, *A. dubius* (1:10).



4.2.1. Detección de Begomovirus en las especies de arvenses asociadas al cultivo de tomate industrial colectadas en el distrito de Los Santos analizadas mediante PCR

En el cuadro VII se presenta los resultados de la prevalencia de infección por Begomovirus de las especies de arvenses recolectadas. Los datos fueron transformados por $\sqrt{x+2}$ para compensar la falta de normalidad de estos y así poder realizar la prueba de hipótesis seleccionada.

Se realizó una prueba de t de Student con un nivel de significancia del 1% para comprobar que la prevalencia de plantas infectadas por Begomovirus en el distrito de Los Santos es diferente de cero ($H_{01}: \mu = 0$). El resultado de la prueba indica que sí existen plantas infectadas por Begomovirus en esta región del país ($p < 0.01$).

De las ciento diez (110) muestras de arvenses analizadas mediante PCR, las especies que resultaron con mayor prevalencia de plantas infectadas por Begomovirus fueron las siguientes: *Mimosa* spp. (100% de las plantas muestreadas), *A. dubius* (100%), *P. angulata* (66.7%), *C. viscosa* (60%), *A. spinosus* (50%), *H. attenuatus* (50%), *R. minima* (47.6%), *C. mucunoides* (44.4%), *M. americanum* (25%), *M. alceifolia* (20%); en términos generales, un 26% de las arvenses resultaron infectadas por Begomovirus.

Cuadro VII. Prevalencia de las especies de arvenses asociadas al cultivo de tomate industrial en el distrito de Los Santos diagnosticadas por PCR.

Especie de arvense	+	-	Total	^a Prevalencia ($\sqrt{x+2}$)
<i>Abutilon</i> sp.	0.00	1.00	1.00	1.41
<i>Amaranthus dubius</i> Mart. ex Thell.	1.00	0.00	1.00	1.73
<i>Amaranthus spinosus</i> (L.)	2.00	2.00	4.00	1.58
<i>Borreria laevis</i> (Lam.) Griseb.	0.00	1.00	1.00	1.41
<i>Calopogonium mucunoides</i> Desv.	4.00	5.00	9.00	1.56
<i>Cleome viscosa</i> (L.)	3.00	2.00	5.00	1.61
<i>Corchorus orinocensis</i> Kunth	0.00	2.00	2.00	1.41
<i>Croton hirtus</i> L'Hér.	0.00	1.00	1.00	1.41
<i>Cucumis melo</i> (L.)	0.00	2.00	2.00	1.41
<i>Desmodium tortuosum</i> Desv.	0.00	2.00	2.00	1.41
<i>Eleutheranthera ruderalis</i> (Sw.) Sch.Bip.	0.00	2.00	2.00	1.41
<i>Euphorbia heterophylla</i> (L.)	0.00	7.00	7.00	1.41
<i>Euphorbia hypericifolia</i> (L.)	0.00	2.00	2.00	1.41
<i>Euphorbia</i> spp.	0.00	1.00	1.00	1.41
<i>Heliotropium indicum</i> (L.)	0.00	3.00	3.00	1.41
<i>Hybanthus attenuatus</i> Humb.& Bonpl. ex Roem. & Schult.	1.00	1.00	2.00	1.58
<i>Jatropha gossypifolia</i> (L.)	0.00	3.00	3.00	1.41
<i>Jatropha integerrima</i> Jacq.	0.00	1.00	1.00	1.41
<i>Kallstroemia maxima</i> Scop.	0.00	3.00	3.00	1.41
<i>Ludwigia</i> sp.	0.00	2.00	2.00	1.41
<i>Malachra alceifolia</i> Jacq.	1.00	6.00	7.00	1.46
<i>Malvastrum americanum</i> (L.) Torr	1.00	3.00	4.00	1.50
<i>Melampodium divaricatum</i> (L. C. Rich.) DC.	0.00	1.00	1.00	1.41
<i>Melochia pyramidata</i> (L.)	0.00	1.00	1.00	1.41
<i>Melochia</i> spp.	0.00	1.00	1.00	1.41
<i>Mimosa</i> spp.	1.00	0.00	1.00	1.73
<i>Momordica charantia</i> (L.)	0.00	1.00	1.00	1.41
<i>Phyllanthus amarus</i> Schum. & Thonn.	0.00	2.00	2.00	1.41
<i>Physalis angulata</i> (L.)	4.00	2.00	6.00	1.63
<i>Portulaca oleraceae</i> (L.)	0.00	5.00	5.00	1.41
<i>Richardia scabra</i> (L.)	0.00	1.00	1.00	1.41
<i>Rhynchosia minima</i> (L.) DC.	10.00	10.00	20.00	1.58
<i>Sida acuta</i> Burm.f.	0.00	3.00	3.00	1.41
<i>Sida</i> spp.	0.00	1.00	1.00	1.41
<i>Spiracantha cornifolia</i> Kunth	0.00	1.00	1.00	1.41
<i>Tridax procumbens</i> (L.)	0.00	1.00	1.00	1.41
Total /Promedio incidencia.	28.00	82.00	110.00	1.47
Varianza	3.66	4.21	12.68	0.01
t Test (P)	<0.000001		**	
t score (calc.)	89.29			
t_{0.01/2} (35 d.f.)	2.724			
CV	0.06			

*p<0.05, **p<0.01 y n.s. p≥0.05

+Fuente: Biometrika tables for statisticians (Pearson y Hartley, 1966).

^aPorcentaje de infección se calculó dividiendo el número de plantas positivas entre el total de muestras analizadas.

Los resultados presentados en el cuadro VII confirman la presencia de arvenses infectadas por Begomovirus en el distrito de Los Santos ($p < 0.01$). Este hecho nos indica que las arvenses no solamente actúan como hospederos alternos de la mosca blanca, sino que también como reservorio de este género de virus los cuales pudieran infectar posteriormente a las plantaciones de tomate en el área conforme lo sugirieron Engel *et al.* (1998) y Fernández *et al.*, (1998). Del mismo modo, ha sido reportado por Fiallo-Olivé *et al.*, (2012) la probabilidad de que algunos de los virus descritos en arvenses son capaces de infectar también a especie de planta de interés económico.

Sin embargo, aunque muchos de los Begomovirus detectados en las distintas especies de arvenses no sean capaces de infectar al cultivo de tomate industrial en la región de Azuero; es posible que sirvan como fuente de variabilidad genética para el complejo local de Begomovirus como lo sugiere Briddon *et al.*, (2010).

Por otra parte, más del 66% de las plantas muestreadas en el distrito de Los Santos de la especie *Physallis angulata* (Magnoliopsida: Solanaceae) resultaron positivas a infección por Begomovirus. Este dato es importante porque esta especie de planta pertenece a la misma familia que el tomate, lo que aumenta el riesgo de que sea tanto un hospedero alternativo de los Begomovirus que infectan al tomate como una fuente de variabilidad genética para estos. La presencia de especies de Begomovirus que infectan arvenses emparentados con aquellos que infectan plantas de interés económico en la región es un hecho demostrado por Díaz *et al.* (2002) y Karkashian *et al.*, (2011) en sus estudios realizados sobre el *Bean golden mosaic virus* y el *Calopogonium golden mosaic virus* en Nicaragua y Costa Rica, puesto que ambos virus afectan a plantas pertenecientes a la familia Fabaceae.

Además, recientemente se ha reportado en áreas colindantes a parcelas de tomate en la localidad de “La Mesa de San Martín”, provincia de Panamá como hospedantes reproductivos de *B. tabaci* a las especies *Physallis angulata* (L.) y *Malachra alceifolia* Jacq. al presentar huevos y ninfas de la mosca blanca (Zachrisson *et al.*, 2017). Estos resultados aunque no pertenecen a las mismas localidades muestreadas concuerdan con los porcentajes de prevalencia de Begomovirus encontrados en la arvense *P. angulata* y *M. alceifolia*.

4.2.2. Detección de Begomovirus en arvenses sintomáticas y asintomáticas asociadas al cultivo de tomate industrial en el distrito de Los Santos analizadas mediante PCR

Las arvenses fueron categorizadas según la presencia o no de síntomas de posible infección viral. Dentro de estos parámetros se obtuvo un total de treinta y tres (33) especies de arvenses sintomáticas y setenta y siete (77) asintomáticas identificadas.

Las familias representativas al momento del muestreo dentro de la categoría asintomática fueron: Amaranthaceae, Asteraceae, Bignoniaceae, Boraginaceae, Cleomaceae, Cucurbitaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Malvaceae, Onagraceae, Phyllanthaceae, Portulacaceae, Rubiaceae, Solanaceae, Sterculiaceae, Tiliaceae, Violaceae y Zygophyllaceae (anexo 10).

Las familias predominantes dentro de la categoría sintomáticas al momento del muestreo fueron: Cucurbitaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae y Malvaceae. Distribuidas dentro de las localidades con excepción de San Luis Gonzaga y La Lomita que no presentaron arvenses sintomáticas al momento de los muestreos.

En el cuadro VIII, se presentan los valores transformados por $\sqrt{x} + 2$ para la prevalencia de infección por Begomovirus en arvenses sintomáticas y asintomáticas.

Cuadro VIII. Prevalencia de Begomovirus en arvenses sintomáticas vs. asintomáticas asociadas al cultivo de tomate industrial colectadas en el distrito de Los Santos (datos transformados por $\sqrt{x+2}$).

Especie	Sintomáticas			Asintomáticas			Total
	+	-	Prevalencia	+	-	Prevalencia	
<i>Abutilon</i> sp.	0.00	0.00	1.41	0.00	1.00	1.41	1.00
<i>Amaranthus dubius</i> Mart. ex Thell.	0.00	0.00	1.41	1.00	0.00	1.73	1.00
<i>Amaranthus spinosus</i> (L.)	0.00	0.00	1.41	2.00	2.00	1.58	4.00
<i>Borreria laevis</i> (Lam.) Griseb.	0.00	0.00	1.41	0.00	1.00	1.41	1.00
<i>Calopogonium mucunoides</i> Desv.	3.00	4.00	1.53	1.00	1.00	1.45	9.00
<i>Cleome viscosa</i> (L.)	0.00	0.00	1.41	3.00	2.00	1.61	5.00
<i>Corchorus orinocensis</i> Kunth	0.00	0.00	1.41	0.00	2.00	1.41	2.00
<i>Croton hirtus</i> L'Hér.	0.00	0.00	1.41	0.00	1.00	1.41	1.00
<i>Cucumis melo</i> (L.)	0.00	1.00	1.41	0.00	1.00	1.41	2.00
<i>Desmodium tortuosum</i> Desv.	0.00	1.00	1.41	0.00	1.00	1.41	2.00
<i>Eleutheranthera ruderalis</i> (Sw.) Sch.Bip.	0.00	0.00	1.41	0.00	2.00	1.41	2.00
<i>Euphorbia heterophylla</i> (L.)	0.00	5.00	1.41	0.00	2.00	1.41	7.00
<i>Euphorbia hypericifolia</i> (L.)	0.00	0.00	1.41	0.00	2.00	1.41	2.00
<i>Euphorbia</i> spp.	0.00	1.00	1.41	0.00	0.00	1.41	1.00
<i>Heliotropium indicum</i> (L.)	0.00	0.00	1.41	0.00	3.00	1.41	3.00
<i>Hybanthus attenuatus</i> Humb.& Bonpl. ex Roem. & Schult.	0.00	0.00	1.41	1.00	1.00	1.58	2.00
<i>Jatropha gossypifolia</i> (L.)	0.00	0.00	1.41	0.00	3.00	1.41	3.00
<i>Jatropha integerrima</i> Jacq.	0.00	0.00	1.41	0.00	1.00	1.41	1.00
<i>Kallstroemia maxima</i> Scop.	0.00	0.00	1.41	0.00	3.00	1.41	3.00
<i>Ludwigia</i> sp.	0.00	0.00	1.41	0.00	2.00	1.41	2.00
<i>Malachra alceifolia</i> Jacq.	0.00	1.00	1.41	1.00	5.00	1.46	7.00
<i>Malvastrum americanum</i> (L.)Torr	0.00	2.00	1.41	1.00	1.00	1.50	4.00
<i>Melampodium divaricatum</i> (L. C. Rich.) DC.	0.00	0.00	1.41	0.00	1.00	1.41	1.00
<i>Melochia pyramidata</i> (L.)	0.00	0.00	1.41	0.00	1.00	1.41	1.00
<i>Melochia</i> spp.	0.00	0.00	1.41	0.00	1.00	1.41	1.00
<i>Mimosa</i> spp.	0.00	0.00	1.41	1.00	0.00	1.73	1.00
<i>Momordica charantia</i> (L.)	0.00	0.00	1.41	0.00	1.00	1.41	1.00
<i>Phyllanthus amarus</i> Schum. & Thonn.	0.00	0.00	1.41	0.00	2.00	1.41	2.00
<i>Physalis angulata</i> (L.)	0.00	0.00	1.41	4.00	2.00	1.63	6.00
<i>Portulaca oleraceae</i> (L.)	0.00	0.00	1.41	0.00	5.00	1.41	5.00

Continuación de cuadro VIII

Especie	Sintomáticas			Asintomáticas			Total
	+	-	Prevalencia	+	-	Prevalencia	
<i>Richardia scabra</i> (L.)	0.00	0.00	1.41	0.00	1.00	1.41	1.00
<i>Rhynchosia minima</i> (L.) DC.	7.00	6.00	1.53	3.00	4.00	1.47	20.00
<i>Sida acuta</i>	0.00	1.00	1.41	0.00	2.00	1.41	3.00
<i>Sida</i> spp.	0.00	1.00	1.41	0.00	0.00	1.41	1.00
<i>Spiracantha cornifolia</i> Kunth	0.00	0.00	1.41	0.00	1.00	1.41	1.00
<i>Tridax procumbens</i> (L.)	0.00	0.00	1.41	0.00	1.00	1.41	1.00
Totales	10.00	23.00	51.14	18.00	59.00	52.52	110.00
Promedio			1.42			1.46	
Varianza			0.00			0.01	
F (calc.)	11.27						**
F_{0.05} (35, 35) / F_{0.01} (35, 35)	1.757 / 2.230 ⁺						
t Test (p)	0.02						*
t score (calc.)	-2.45						
t_{0.05/2} (35 d.f.)	2.03						
CV	0.01						

Los resultados de prevalencia por infección de Begomovirus en las especies asintomáticas fueron: *A. dubius* (100%), *Mimosa* spp. (100%), *C. viscosa* (66.7), *A. spinosus* (50%), *H. attenuatus* (50%), *M. americanum* (50%), *R. minima* (42.9%) y *M. alceifolia* (16.7%).

Por su parte, las especies sintomáticas con mayor prevalencia presentaron *C. muconoides* (42.8%) y *R. minima* (46.2%).

Se realizó una prueba de *t* de Student para dos grupos de muestras con varianzas heterogéneas ($p < 0.01$) con un nivel de significancia del 1% para verificar la diferencia en la prevalencia de plantas infectadas por Begomovirus entre las plantas sintomáticas (μ_1) y las asintomáticas (μ_2). Es decir; $H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$.

El resultado de la prueba indica que hay una mayor prevalencia de plantas infectadas por Begomovirus en el grupo de plantas con síntomas de virosis que en el de las plantas asintomáticas ($p < 0.01$).

Los resultados presentados en el cuadro VIII muestran que la mayor cantidad de arvenses infectadas por Begomovirus presentan síntomas comúnmente asociados en el área con infecciones virales ($p < 0.01$), es decir, son sintomáticas. Esto no coincide con lo reportado por Salati, *et al.*, (2002) en República Dominicana.

Sin embargo, al observar que los porcentajes de infección son cercanos entre arvenses sintomáticas y asintomáticas (21.9 y 16%) respectivamente, la cantidad de inóculo presente en el agroecosistema al momento de establecer el cultivo puede ser subestimada fácilmente por el productor.

Algunas de las consideraciones que se mencionan comúnmente ante arvenses infectadas por virus es la remoción de éstas de los alrededores de cultivos de interés económico. Sin embargo, Lastres (1991) menciona que debe considerarse que la eliminación de malezas no siempre reduce la prevalencia de virus en un cultivo, en algunos casos puede incrementar la infección ya que induce al vector a trasladarse de las malezas al cultivo. Valdivia *et al.*,

(1992) afirma que los métodos que se empleen para la reducción del inoculo viral que incluyan eliminación de malezas reportadas como hospederas y siembra en tiempo apropiado deben ser consideradas como preventivos, no curativos.

4.2.3. Detección de Begomovirus en época de cultivo y barbecho en arvenses asociadas al cultivo de tomate industrial en el distrito de Los Santos analizadas mediante PCR

En la época de cultivo 2016 se evaluaron un total de treinta y cinco (35) muestras de arvenses para detectar la presencia o ausencia de Begomovirus. Las muestras evaluadas durante esta época pertenecían a doce (12) familias, representadas por dieciocho (18) especies. Los resultados obtenidos indican que once (11) muestras pertenecientes a dos (2) familias y cuatro (4) especies fueron diagnosticadas positivas a Begomovirus mediante PCR. Dichas muestras correspondían a las familias Fabaceae (*R. minima*, *C. muconoides* y *Mimosa* sp.) y Solanaceae (*P. angulata*) (anexo 10).

De la misma manera, en la época de barbecho 2016 se evaluaron treinta y dos (32) muestras correspondientes a diez (10) familias y veinte (20) especies de arvenses. Los resultados obtenidos muestran que nueve (9) muestras pertenecientes a seis (6) familias y siete (7) especies resultaron con diagnostico positivo a infección por Begomovirus. Dentro de los resultados positivos obtenidos se encontraban las familias: Amaranthaceae (*A. dubius*), Cleomaceae (*C. viscosa*), Fabaceae (*C. muconoides* y *R. minima*), Malvaceae (*M. americanum*), Solanaceae (*P. angulata*) y Violaceae (*H. attenuatus*) (anexo 10).

Tambien se evaluaron arvenses dentro de la época de cultivo 2017. Sin embargo, las fincas fueron distintas a las del año 2016. En este trabajo no se incluyen los resultados de los muestreos correspondiente a la época de barbecho 2017.

En la época de cultivo del 2017 se muestrearon cuatro (4) fincas ubicadas en La Espigadilla, La Lomita y dos (2) en la localidad de La Honda (cuadro IV). Se evaluaron cuarenta y tres (43) muestras compuestas por diecisiete (17) familias y veintiuno (21) especies. Los resultados obtenidos presentaron un total de ocho (8) muestras, cinco (5) familias y cinco (5) especies diagnosticadas positivas a infección viral por Begomovirus. Las muestras positivas pertenecían a las familias de Amaranthaceae (*A. spinosus*), Cleomaceae (*C. viscosa*), Fabaceae (*R. minima*), Malvaceae (*M. alceifolia*) y Solanaceae (*P. angulata*) (anexo 10).

En el cuadro IX, se presenta los resultados obtenidos para prevalencia de Begomovirus en la época de cultivo vs. la de barbecho durante la temporada 2016-2017 transformados por $\sqrt{x + 2}$.

Cuadro IX. Prevalencia de Begomovirus en la época de cultivo vs. la de barbecho en arvenses asociadas al cultivo de tomate industrial en el distrito de Los Santos mediante PCR (datos transformados por $\sqrt{x+2}$).

# Finca	Barbecho	Cultivo
1	1.449	1.414
2	1.472	1.472
3	1.483	1.527
4	1.549	1.667
5	1.581	1.500
6	1.658	1.472
7		1.472
8		1.449
9		1.512
10		1.494
Promedio	1.532	1.498
F test (p)	0.507	n.s.
F calc.	1.176	n.s.
t test (p)	0.372	n.s.
t score (calc.)	-0.907	n.s.
t 0.05/2 (14 d.f.)	2.145⁺	
CV	0.047	

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y n.s. $p \geq 0.05$

+Fuente: Biometrika tables for statisticians (Pearson y Hartley, 1966).

Se realizó una prueba de t de Student con un nivel de significancia del 5% para muestras no pareadas con varianzas homogéneas ($p > 0.05$) para demostrar que la prevalencia de arvenses infectadas por Begomovirus varía durante la época de barbecho (μ_1) con respecto a la época de cultivo (μ_2) es decir: $H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$ En donde: μ_1 es el valor promedio de la prevalencia de plantas infectadas por Begomovirus durante el barbecho y μ_2 es el valor promedio de la prevalencia durante la época de cultivo.

El resultado de la prueba indica que la prevalencia de arvenses infectadas por Begomovirus no varió significativamente a lo largo del año ($p > 0.05$) (cuadro IX).

Estos resultados sugieren que las arvenses se encuentran contribuyendo a mantener la infección por Begomovirus de manera constante. Durante la temporada de cultivo, el vector se alimenta de las plantas de tomate mientras que las arvenses le proveen refugio y alimento durante la época de barbecho o viceversa como menciona Norris y Kogan *et al.*, (2005).

La gran capacidad innata de sobrevivencia de las arvenses les permite a varios individuos persistir en el ecosistema a lo largo del año. Sin embargo, esta situación les expone a infecciones por Begomovirus provenientes de las moscas blancas (*B. tabaci*) virulíferas de la zona. Este hecho permite la propagación y recombinación de los Begomovirus en hospederos vegetales alternativos aún en épocas con ausencia de los hospederos de interés económico (Gilbertson *et al.*, 1991; Bedford *et al.*, 1998).

Autores como Krupovic *et al.* (2009) indican que segmentos de *ssADN* del genoma de los Begomovirus conocidos como: ADN-A, ADN-B, alfa-satélites y beta-satélites pueden recombinarse cuando dos especies de Begomovirus infectan simultáneamente a un mismo hospedero produciendo una nueva cepa de Begomovirus. Este evento, conocido como Pseudorecombinación, podría estar ocurriendo en el distrito de Los Santos a lo largo de todo el año ya que tanto las arvenses, como en el vector (*B. tabaci*) y el cultivo son hospederos de Begomovirus y la prevalencia de este tipo de virus en el complejo de arvenses no varía significativamente ($p>0.05$) a lo largo del año.

CONCLUSIONES

1. Se lograron identificar treinta y siete (37) especies de arvenses dicotiledóneas, pertenecientes a dieciocho (18) familias asociadas al cultivo de tomate industrial en el distrito de Los Santos.
2. Resultaron positivas a Begomovirus diez (10) especies pertenecientes a seis (6) familias de arvenses asociadas al cultivo de tomate industrial en el distrito de Los Santos mediante la técnica de PCR.
3. Se encontraron especies de arvenses asociadas al cultivo de tomate industrial en el distrito de Los Santos con prevalencias altamente significativas por Begomovirus.
4. De las ciento diez (110) muestras de arvenses analizadas mediante PCR, las especies que resultaron con mayor prevalencia de plantas infectadas por Begomovirus fueron las siguientes: *Mimosa* spp. (100% de las plantas muestreadas), *A. dubius* (100%), *P. angulata* (66.7%), *C. viscosa* (60%), *A. spinosus* (50%), *H. attenuatus* (50%), *R. minima* (47.6%), *C. mucunoides* (44.4%), *M. americanum* (25%), *M. alceifolia* (20%).
5. Se encontró diferencia significativa en la prevalencia de arvenses asociadas al cultivo de tomate industrial infectadas por Begomovirus en el grupo de plantas con síntomas (21.9%) de virosis con respecto a las plantas asintomáticas (16%) ($p<0.01$).

6. Los resultados de prevalencia por infección de Begomovirus en las especies asintomáticas asociadas al cultivo de tomate industrial fueron: *A. dubius* (100%), *Mimosa* spp. (100%), *P. angulata* (66.7%), *C. viscosa* (60%), *A. spinosus* (50%), *C. muconoides* (50%), *H. attenuatus* (50%), *M. americanum* (50%), *R. minima* (42.9%) y *M. alceifolia* (16.7%). Por su parte, las especies sintomáticas con mayor prevalencia presentaron *R. minima* (53.8%) y *C. muconoides* (42.8%).
7. Las arvenses *A. dubius*, *A. spinosus*, *C. muconoides*, *C. viscosa*, *H. attenuatus*, *M. alceifolia*, *M. americanum*, *Mimosa* spp., *P. angulata* y *R. minima* son reportadas por primera vez como hospederas de Begomovirus asociadas al cultivo de tomate industrial en la región del distrito de Los Santos. La especie *Mimosa* sp. no se encuentra reportada como hospedero alternativo del género Begomovirus en Latinoamérica y el Caribe, por tanto esta es la primera vez.
8. Se destaca la importancia de las especies *R. minima* y *C. muconoides* debido a que presentaron resultados positivos a infección por Begomovirus tanto en plantas asintomáticas como sintomáticas asociadas al cultivo de tomate industrial. De igual modo, estas mismas arvenses fueron diagnosticadas con Begomovirus durante la temporada de cultivo y la de barbecho.
9. La especie *P. angulata*, diagnosticada con infección viral por Begomovirus, sin síntomas y colectadas durante las temporadas de cultivo y barbecho, representa según los datos obtenidos en este trabajo como la arvense con mayor potencial de riesgo como hospedero de Begomovirus al pertenecer a la misma familia botánica que el cultivo de tomate.
10. No se encontró diferencias significativas ($p>0.05$) en los valores de prevalencia de infección por Begomovirus entre las arvenses colectadas durante la temporada de cultivo y la de Barbecho.

RECOMENDACIONES

1. Prestar atención a la dinámica poblacional de las arvenses diagnosticadas positivas a Begomovirus asociadas al cultivo de tomate industrial en el distrito de Los Santos, para reducir las potenciales fuentes de inóculo.
2. Se aconseja realizar ajustes al protocolo de extracción de ADN para la especie de arvense *Sida* spp. porque no fue posible obtener resultados positivos para infección por Begomovirus a pesar de que se trata de un hospedero ampliamente reportado en Latinoamérica.
3. La eliminación de las arvenses dicotiledóneas de las parcelas de cultivo y sus áreas aledañas (tanto durante el barbecho como en la época de cultivo) pudiera contribuir a la disminución de la prevalencia de plantas infectadas por Begomovirus. Sin embargo, debe considerarse las posibles especies benéficas que utilizan estas arvenses como hospedero.
4. Las arvenses *Jatropha gossypifolia* (L.), *Cucumis melo* (L.), *Bactocytia unguis* (L.) Mart., *Malachra alceifolia* Jacq. categorizadas como dudosas deben ser analizadas nuevamente por PCR para corroborar la presencia o ausencia de Begomovirus.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ACEVEDO-ROCHA, C. G., FANG, G., SCHMIDT, M., USSERY, D. W. & DANCHIN, A. 2013. From essential to persistent genes: a functional approach to constructing synthetic life. *Trends in genetics: TIG*, 29(5), 273–279. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.11.001>

AGRIOS, G. N. 2005. *Plant pathology* (5th ed.). Burlington, MA: Elsevier Academic Press. 838 pp.

ANDERSON, P. K. & F. J. MORALES. 2005. Whitefly and whitefly-borne viruses in the tropics: Building a knowledge base for global action. *Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)*, 351 p.

ALA-POIKELA, M., SVENSSON, E., ROJAS, A., HORKO, T., PAULIN, L., VALKONEN, J. P. T. & KVARNHEDEN, A. 2005. Genetic diversity and mixed infections of begomoviruses infecting tomato, pepper and cucurbit crops in Nicaragua. *Plant Pathology*, 54(4), 448–459. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2005.01226.x>

AMARAKOON, I. I., ROYE, M. E., BRIDDON, R. W., BEDFORD, I. D. & STANLEY, J. 2008. Molecular and biological characterization of *Macropitium* yellow mosaic virus from Jamaica. *Plant Pathology*, 57(3), 417–426. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01816.x>

ARNIM, A. V., FRISCHMUTH, T. & STANLEY, J. 1993. Detection and possible functions of African cassava mosaic virus DNA B gene products. *Virology*, 192(1), 264–272. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1029>

BARRETO, S. S., HALLWASS, M., AQUINO, O. M. & INOUE-NAGATA, A. K. 2013. A study of weeds as potential inoculum sources for a tomato-infecting begomovirus in central Brazil. *Phytopathology*, 103(5), 436–444. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-12-0174-R>

BEDFORD, I. D., KELLY, A., BANKS, G. K., BRIDDON, R. W., CENIS, J. L., & MARKHAM, P. G. 1998. *European Journal of Plant Pathology*, 104(2), 221–222. <https://doi.org/10.1023/A:1008627419450>

BISARO, D. M. 1996. Geminivirus DNA Replication. *Eukaryotic Cells*, 833–854. Retrieved from <https://pdfs.semanticscholar.org/8630/d602afc2dba379228ab764c1d47089c2c467.pdf>

BOCK, K. R. & GUTHRIE, E. J. 1978. Transmission of African cassava mosaic by mechanical inoculation. *Plant Disease Reporter*.

BRIDDON, R. W., PATIL, B. L., BAGEWADI, B., NAWAZ-UL-REHMAN, M. S. & FAUQUET, C. M. 2010. Distinct evolutionary histories of the DNA-A and DNA-B components of bipartite begomoviruses. *BMC evolutionary biology*, 10, 97. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-97>

BROWN, J. K. & BIRD, J. 1992. Whitefly-Transmitted Geminiviruses and Associated Disorders in the Americas and the Caribbean Basin. *Plant Disease*, 76(3), 220. <https://doi.org/10.1094/PD-76-0220>

BROWN, J. K., FROHLICH, D. R., & ROSELL, R. C. 1995. The sweetpotato or silverleaf whiteflies: Biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? *Annual Review of Entomology*, 40(1), 511-534.

BROWN, J. K., LASTRA, R., & BIRD, J. 1991. First documentation of whitefly-transmitted geminiviruses causing widespread disease in cotton, tobacco and tomato in Dominican Republic and in tomato in Puerto Rico. *Fitopatologia*. 26:47.

BROWN, J. K., ZERBINI, F. M., NAVAS-CASTILLO, J., MORIONES, E., RAMOS-SOBRINHO, R., SILVA, J. C. F. & VARSANI, A. 2015. Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Archives of virology*, 160(6), 1593–1619. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2398-y>

CASTILLO-URQUIZA, G. P., BESERRA, J. E. A., BRUCKNER, F. P., LIMA, A. T. M., VARSANI, A., ALFENAS-ZERBINI, P. & MURILO ZERBINI, F. 2008. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Archives of virology*, 153(10), 1985–1989. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0172-0>

COLLINS, A. M. & ROYE, M. E. 2007. Two new bipartite begomoviruses infecting *Wissadula amplissima* in Jamaica. *Plant Pathology*, 56(2), 340. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01514.x>

- COLLINS, A. M., BROWN, J. K., MUJADDAD REHMAN, M. & ROYE, M. E. 2009. Complete nucleotide sequence of an isolate of Euphorbia mosaic virus that infects Euphorbia heterophylla and Wissadula amplissima in Jamaica. Archives of virology, 154(11), 1859–1860. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0508-4>
- COLLINS, A., REHMAN, M. M., CHOWDA-REDDY, R. V., WANG, A., FONDONG, V., BROWN, J. & ROYE, M. 2010. Molecular characterization and experimental host range of an isolate of Macropodium golden mosaic virus that infects Wissadula amplissima in Jamaica. Virus research, 150(1-2), 148–152. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.03.008>
- COSTA, A. S. 1976. Whitefly-transmitted plant diseases. Annual review of phytopathology, 14(1), 429-449.
- DELLAPORTA, S. L., WOOD, J. & HICKS, J. B. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. Plant Molecular Biology Reporter, 1(4), 19–21. <https://doi.org/10.1007/BF02712670>
- DIAZ, M., MAXWELL, D. P., KARKASHIAN, J. P. & RAMÍREZ, P. 2002. Calopogonium golden mosaic virus Identified in Phaseolus vulgaris from Western and Northern Regions of Costa Rica. Plant Disease, 86(2), 188. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.2.188B>
- DUFFUS, J. E. 1987. Whitefly Transmission of Plant Viruses. In K. F. Harris (Ed.), Current Topics in Vector Research, 0934-6112: Vol. 4. Current Topics in Vector Research (pp. 73–91). New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-4712-8_3
- ECHEMENDIA, A. L., RAMOS, P. L., DIAZ, L., PERAL, R., FUENTES, A., PUJOL, M., & GONZALEZ, G. 2004. First report of Sida golden yellow vein virus infecting Sida species in Cuba. Plant Pathology, 53(2), 234. <https://doi.org/10.1111/j.0032-0862.2004.00965.x>
- EMPRESA DE TRANSMISIÓN ELÉCTRICA S.A. (E.T.E.S.A). 2015. Disponible en: <https://web.archive.org/web/20131022231026/http://wwis.inm.es/076/c01243.htm>
- ENGEL, M., FERNÁNDEZ, O., JESKE, H. & FRISCHMUTH, T. 1998. Molecular characterization of a new whitefly-transmissible bipartite geminivirus infecting tomato in Panama. The Journal of general virology, 79 (Pt 10), 2313–2317. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-10-2313>

FAUQUET C. M., BISARO D. M., BRIDDON R. W., BROWN J. K., HARRISON B. D., RYBICKI E. P., STENGER D. C. & ASTANLEY J. 2003. Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family Geminiviridae, and an updated list of Begomovirus species. *Archives of Virology* 148:405-421.

FERNANDES, A. V., MARIANO, A. C., GALVAO, R. M., ZERBINI, F. M. & FONTES, E. P. B. 2008. Molecular cloning of Sida Yellow Mosaic Virus: a new sida-infecting geminivirus from Brazil. "Unpublished"

FERNANDES, F. R., ALBUQUERQUE, L. C., OLIVEIRA, C. L. DE, CRUZ, A. R. R., DA ROCHA, W. B., PEREIRA, T. G., INOUE-NAGATA, A. K. 2011. Molecular and biological characterization of a new Brazilian begomovirus, euphorbia yellow mosaic virus (EuYMV), infecting Euphorbia heterophylla plants. *Archives of virology*, 156(11), 2063–2069. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1070-4>

FERNANDES, J. J., CARVALHO, M. G., ANDRADE, E. C., BROMMONSCHENKEL, S. H., FONTES, E. P. B., & ZERBINI, F. M. 2006. Biological and molecular properties of Tomato rugose mosaic virus (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. *Plant Pathology*, 55(4), 513-522.

FERNÁNDEZ O, OSORIO O. & FRISCHMUTH T. 1998. Detección de Geminivirus en Malezas Asociadas al Cultivo de Tomate en Panamá. Memoria VII Taller Latinoamericano y del Caribe de Mosca Blanca y Geminivirus. Nicaragua

FIALLO-OLIVÉ, E., CHIRINOS, D. T., GERAUD-POUEY, F., & NAVAS-CASTILLO, J. 2017. Complete genome sequence of Jacquemontia yellow vein virus, a novel begomovirus infecting Jacquemontia tamnifolia in Venezuela. *Archives of virology*, 162(8), 2463–2466. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3372-7>

FIALLO-OLIVÉ, E., CHIRINOS, D. T., GERAUD-POUEY, F., MORIONES, E., & NAVAS-CASTILLO, J. 2014. Complete genome sequence of Jacquemontia yellow mosaic virus, a novel begomovirus from Venezuela related to other New World bipartite begomoviruses infecting Convolvulaceae. *Archives of virology*, 159(7), 1857–1860. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-1996-4>

FIALLO-OLIVÉ, E., MARQUEZ-MARTIN, B., CHIRINOS, D., GERAUD-POUEY, F., NAVAS-CASTILLO, J. AND MORIONES, E. "Four novel begomoviruses infecting common bean and weeds in Venezuela" Unpublished (as of 27 Aug 2012)

FIALLO-OLIVÉ, E., NAVAS-CASTILLO, J., MORIONES, E. & MARTÍNEZ-ZUBIAUR, Y. 2010. Two novel begomoviruses belonging to different lineages infecting

Rhynchosia minima. Archives of virology, 155(12), 2053–2058.
<https://doi.org/10.1007/s00705-010-0803-0>

FIALLO-OLIVÉ, E., NAVAS-CASTILLO, J., MORIONES, E. & MARTÍNEZ-ZUBIAUR, Y. 2012. Begomoviruses infecting weeds in Cuba: increased host range and a novel virus infecting *Sida rhombifolia*. Archives of virology, 157(1), 141–146.
<https://doi.org/10.1007/s00705-011-1123-8>

FRISCHMUTH, T., ENGEL, M., LAUSTER, S., & JESKE, H. 1997. Nucleotide sequence evidence for the occurrence of three distinct whitefly-transmitted, *Sida*-infecting bipartite geminiviruses in Central America. The Journal of general virology, 78 (Pt 10), 2675–2682.
<https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-10-2675>

GARCÍA-ANDRÉS, S., MONCI, F., NAVAS-CASTILLO, J. & MORIONES, E. 2006. Begomovirus genetic diversity in the native plant reservoir *Solanum nigrum*: Evidence for the presence of a new virus species of recombinant nature. Virology, 350(2), 433–442.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.02.028>

GARIBYAN, L. & AVASHIA, N. 2013. Polymerase chain reaction. The Journal of investigative dermatology, 133(3), e6. https://doi.org/10.1038/jid.2013.1*

GILBERTSON, R. L., ROJAS, M. R., RUSSELL, D. R., & MAXWELL, D. P. 1991. Use of the asymmetric polymerase chain reaction and DNA sequencing to determine genetic variability of bean golden mosaic geminivirus in the Dominican Republic. The Journal of general virology, 72 (Pt 11), 2843–2848. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-72-11-2843>

GRAHAM A.P., STEWART C.S. & ROYE M.E. 2006. First report of a begomovirus infecting two common weeds: *Malvastrum americanum* and *Sida spinosa* in Jamaica. New Disease Reports (2006) 13, 44. Retrieved from <https://www.ndrs.org.uk/article.php?id=013044>

GRAHAM, A. P., MARTIN, D. P. & ROYE, M. E. 2010. Molecular characterization and phylogeny of two begomoviruses infecting *Malvastrum americanum* in Jamaica: evidence of the contribution of inter-species recombination to the evolution of malvaceous weed-associated begomoviruses from the northern Caribbean. Virus genes, 40(2), 256–266.
<https://doi.org/10.1007/s11262-009-0430-6>

HAIDER, M. S. & TAHIR, M. 2004. Begomovirus transmission by mechanical inoculation, grafting, determination of host range and symptomatology. Mycopath (2004), 2(2) 95-100. School of Biological Sciences University of the Punjab.

[http://pu.edu.pk/images/journal/impp/onlineconpdf/Vol.2\(2\)%202004/MYCOPATH-11.pdf](http://pu.edu.pk/images/journal/impp/onlineconpdf/Vol.2(2)%202004/MYCOPATH-11.pdf)

HAMILTON, W.D.O., BISARO, D. M., COUTTS, R.H.A. & BUCK, K. W. 1983. Demonstration of the bipartite nature of the genome of a single-stranded DNA plant virus by infection with the cloned DNA components. *Nucleic Acids Research*, 11(21), 7387–7396. <https://doi.org/10.1093/nar/11.21.7387>

HANLEY-BOWDOIN, L., SETTLAGE, S. B., OROZCO, B. M., NAGAR, S. & ROBERTSON, D. 2000. Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 35(2), 105–140.

HARRISON, B. D. 1985. Advances in Geminivirus Research. *Annual review of phytopathology*, 23(1), 55–82. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.23.090185.000415>.

HEIJTING, S., VAN DER WERF, W., STEIN, A., & KROPFF, M. J. 2007. Are weed patches stable in location? Application of an explicitly two-dimensional methodology. *Weed Research*, 47(5), 381–395. Recuperado de <http://edepot.wur.nl/121916#page=37>

HERNÁNDEZ S., FERNÁNDEZ C., BAPTISTA L., P. 2014. Metodología de la Investigación. Colombia: McGraw-Hill.

HERNÁNDEZ-ZEPEDA, C., BROWN, J. K., MORENO-VALENZUELA, O. A., ARGÜELLO-ASTORGA, G., IDRIS, A. M., CARNEVALI, G., & RIVERA-BUSTAMANTE, R. F. 2010. Characterization of Rhynchosia yellow mosaic Yucatan virus, a new recombinant begomovirus associated with two fabaceous weeds in Yucatan, Mexico. *Archives of virology*, 155(10), 1571–1579. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0730-0>

HILJE, L. (Ed.). 1996. Metodologías para el estudio y manejo de moscas blancas y Geminivirus. Serie Materiales de Enseñanza: Vol. 37. Turrialba, Costa Rica.

HÖFER, P., ENGEL, M., JESKE, H., & FRISCHMUTH, T. 1997. Nucleotide sequence of a new bipartite geminivirus isolated from the common weed *Sida rhombifolia* in Costa Rica. *The Journal of general virology*, 78 (Pt 7), 1785–1790. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-7-1785>

IDRIS, A. M., MILLS-LUJAN, K., MARTIN, K., & BROWN, J. K. 2008. Melon chlorotic leaf curl virus: Characterization and differential reassortment with closest relatives reveal adaptive virulence in the squash leaf curl virus clade and host shifting by the host-restricted

bean calico mosaic virus. *Journal of virology*, 82(4), 1959–1967.
<https://doi.org/10.1128/JVI.01992-07>

INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA Y CENSO (INEC). 2014. Departamento de Planificación Sectorial. Disponible en: <https://www.contraloria.gob.pa/inec/>

ILYAS, M., QAZI, J., MANSOOR, S. & BRIDDON, R. W. 2009. Molecular characterisation and infectivity of a "Legumovirus" (genus Begomovirus: family Geminiviridae) infecting the leguminous weed *Rhynchosia minima* in Pakistan. *Virus research*, 145(2), 279–284. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.07.018>

JOVEL, J., PREISS, W., & JESKE, H. 2007. Characterization of DNA intermediates of an arising geminivirus. *Virus research*, 130(1-2), 63–70.
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.05.018>

JOVEL, J., RESKI, G., ROTHENSTEIN, D., RINGEL, M., FRISCHMUTH, T. & JESKE, H. 2004. Sida micrantha mosaic is associated with a complex infection of begomoviruses different from Abutilon mosaic virus. *Archives of virology*, 149(4), 829–841.
<https://doi.org/10.1007/s00705-003-0235-1>

KARKASHIAN, J., RAMOS-REYNOSO, E. D., MAXWELL, D. P. & RAMÍREZ, P. 2011. Begomoviruses Associated with Bean Golden Mosaic Disease in Nicaragua. *Plant Disease*, 95(8), 901–906. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-10-0165>

KRUPOVIC, M., RAVANTTI, J. J. & BAMFORD, D. H. 2009. Geminiviruses: a tale of a plasmid becoming a virus. *BMC evolutionary biology*, 9, 112. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-112>

LASTRES, L. 1991. Generalidades sobre los virus no persistentes de las cucúrbitas. *El melonero (Honduras)* (1) : 1-4.

LAZAROWITZ, S.G. 1992. Geminiviruses: Genome structure and function. *Crit. Rev. Plant Sci.* 11: 327-349.

LAZAROWITZ, S.G., L.C. WU, S.G. ROGERS, & J.S. ELMER. 1992. Sequence-specific interaction with the viral AL1 protein identifies a geminivirus DNA replication origin. *Plant Cell* 4: 799-809.

LIU, S., BEDFORD I. D., BRIDDON R. W., & MARKHAM P.G. 1997. Efficient whitefly transmission of African cassava mosaic geminivirus requires sequences from both genomic components. *Journal of Virology* 78:1791-1794

MAELZER, D. A. 1986. Integrated control of insect vectors of plant virus diseases. In McLean, GD; Garret, RG; Ruesink, WG. eds. *Plant Viruses Epidemics*. New York, US, Academic Press. p. 483-512.

MATTHEWS, R.E.F. (1982). Classification and nomenclature of viruses. Fourth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology*, 17(1-3), 1-199.

MCLAUGHLIN, P. D., MCLAUGHLIN, W. A., MAXWELL, D. P. & ROYE, M. E. 2008. Identification of Begomoviruses Infecting Crops and Weeds in Belize. *Plant Viruses*, 2(1), 58-63.

MEHTA, P., WYMAN, J.A., NAKHLA, M.K., MAXWELL, D.P. 1994. Transmission of tomato yellow leaf curl geminivirus by *Bemisia tabaci* (Homoptera : Aleyrodidae). *Journal of Economy Entomology* 87:1291-1297

MELGAREJO, T. A., KON, T., ROJAS, M. R., PAZ-CARRASCO, L., ZERBINI, F. M., & GILBERTSON, R. L. 2013. Characterization of a new world monopartite begomovirus causing leaf curl disease of tomato in Ecuador and Peru reveals a new direction in geminivirus evolution. *Journal of virology*, 87(10), 5397-5413. <https://doi.org/10.1128/JVI.00234-13>

MORALES, F. J., & ANDERSON, P. K. 2001. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Arch. Virol.* 146:415-441.

MORRA, M. R. & PETTY, I. T. 2000. Tissue specificity of geminivirus infection is genetically determined. *The Plant cell*, 12(11), 2259-2270.

NAGAR, S. 2002. Host DNA Replication Is Induced by Geminivirus Infection of Differentiated Plant Cells. *THE PLANT CELL ONLINE*, 14(12), 2995-3007. <https://doi.org/10.1105/tpc.005777>

NAWAZ-UL-REHMAN, M. S. & FAUQUET, C. M. 2009. Evolution of geminiviruses and their satellites. *FEBS Letters*, 583(12), 1825-1832. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.05.045>

NORRIS, R. F., & KOGAN, M. 2005. Ecology of interactions between weeds and arthropods. *Annual Review of Entomology*, 50, 479-503. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.49.061802.123218>

ORMEÑO, J., SEPÚLVEDA, P., & REBUFEL, P. 2003. Malezas: Hospederos alternativos de virus en pimiento. *Tierra Adentro*, 52. Recuperado de: <http://www2.inia.cl/medios/biblioteca/ta/NR30114.pdf>

- PADIDAM, M., SAWYER, S. & FAUQUET, C. M. 1999. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology*, 265(2), 218–225. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.0056>
- PAPROTKA, T., METZLER, V. & JESKE, H. 2010. The first DNA 1-like alpha satellites in association with New World begomoviruses in natural infections. *Virology*, 404(2), 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.05.003>
- PEARSON, E. S. & HARTLEY, H. O. 1966. *Biometrika tables for statisticians* (3rd ed., 146 pp). Cambridge, England: Biometrika Trustees at the University Press.
- PERRING, T. M. 2001. The Bemisia tabaci species complex. *Crop Protection*, 20(9), 725–737. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(01\)00109-0](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(01)00109-0)
- POLSTON, J. E; ANDERSON, P. K. 1997. The emergence of whiteflytransmitted geminiviruses in tomato in the Western Hemisphere. *Plant Disease* 81:1358-1369.
- RAMOS, P. L., GUEVARA-GONZÁLEZ, R. G., PERAL, R., ASCENCIO-IBÁÑEZ, J. T., POLSTON, J. E., ARGÜELLO-ASTORGA, G. R. & RIVERA-BUSTAMANTE, R. F. 2003. Tomato mottle Taino virus pseudorecombines with PYMV but not with ToMoV: implications for the delimitation of cis- and trans-acting replication specificity determinants. *Archives of virology*, 148(9), 1697–1712. <https://doi.org/10.1007/s00705-003-0136-3>
- ROJAS, A., KVARNHEDEN, A. & VALKONEN, J. P. T. 2000. Geminiviruses Infecting Tomato Crops in Nicaragua. *Plant Disease*, 84(8), 843–846. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.8.843>
- ROJAS, M. R., HAGEN, C., LUCAS, W. J. & GILBERTSON, R. L. 2005. Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. *Annual review of phytopathology*, 43, 361–394. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135939>
- ROSALES, M., SEPÚLVEDA, P., SEPÚLVEDA, G., & BROWN, J. 2009. Caracterización molecular preliminar del complejo mosquita blanca-Begomovirus presente en la Región de Arica, Parinacota en Chile. *Boletín INIA*, N° 224, 137.
- ROYE M. E., COLLINS A. M., MAXWELL D. P. 2006. First report of a begomovirus associated with the common weed *Jatropha gossypifolia* in Jamaica. *Plant Pathol* 55: 286.
- ROYE, M. E., MCLAUGHLIN, W. A., NAKHLA, M. K. & MAXWELL, D. P. 1997. Genetic Diversity Among Geminiviruses Associated with the Weed Species *Sida* spp.,

Macropodium lathyroides, and *Wissadula amplissima* from Jamaica. *Plant Disease*, 81(11), 1251–1258. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.11.1251>

RYCHLIK, W., SPENCER, W. J., & RHOADS, R. E. 1990. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Research*, 18(21), 6409–6412

SALATI, R., NAHKLA, M. K., ROJAS, M. R., GUZMAN, P., JAQUEZ, J., MAXWELL, D. P. & GILBERTSON, R. L. 2002. Tomato yellow leaf curl virus in the Dominican Republic: Characterization of an Infectious Clone, Virus Monitoring in Whiteflies, and Identification of Reservoir Hosts. *Phytopathology*, 92(5), 487–496. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.5.487>

SAUNDERS, K., BEDFORD, I. D. & STANLEY, J. 2001. Pathogenicity of a natural recombinant associated with ageratum yellow vein disease: implications for geminivirus evolution and disease aetiology. *Virology* 282, 38–47.

SAUNDERS, K., LUCY, A. & STANLEY, J. 1992. RNA-primed complementary-sense DNA synthesis of the geminivirus African cassava mosaic virus. *Nucleic Acids Research*, 20(23), 6311–6315. <https://doi.org/10.1093/nar/20.23.6311>

SAUNDERS, K.; LUCY, A.; STANLEY, J. 1991. DNA forms of the geminivirus African cassava mosaic virus consistent with a rolling circle mechanism of replication. *Nucleic acids Research* 19:2325-2330.

SIMMONDS-GORDON, R. N., COLLINS-FAIRCLOUGH, A. M., STEWART, C. S. & ROYE, M. E. 2014. First report of a complete genome sequence for a begomovirus infecting *Jatropha gossypifolia* in the Americas. *Archives of virology*, 159(10), 2815–2818. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2112-5>

STANLEY J., BISARO D. M., BRIDDON R. W., BROWN J. K., FAUQUET C. M., HARRISON B. D., RYBICKI E. P. & STENGER D. C. 2005. Geminiviridae. In: *Virus Taxonomy*, VIIIth Report of the ICTV (C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, and L.A. Ball, eds), 301-326. Elsevier/Academic Press, London.

STEWART, C. S., KON, T., GILBERTSON, R. L. & ROYE, M. E. 2011. First report of the complete sequence of Sida golden yellow vein virus from Jamaica. *Archives of virology*, 156(8), 1481–1484. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1030-z>

STEWART, C., KON, T., ROJAS, M., GRAHAM, A., MARTIN, D., GILBERTSON, R., & ROYE, M. 2014. The molecular characterisation of a Sida-infecting begomovirus from Jamaica. *Archives of virology*, 159(2), 375–378. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1814-4>

TAVARES, S. S., RAMOS-SOBRINHO, R., GONZÁLEZ-AGUILERA, J., LIMA, G. S. A., ASSUNÇÃO, I. P., & ZERBINI, F. M. 2012. Further molecular characterization of weed-associated begomoviruses in Brazil with an emphasis on *Sida* spp. *Planta Daninha*, 30(2), 305-315.

TENJO, J., & ALEJANDRO, D. 2013. Dinámica espacial y temporal de poblaciones de malezas en cultivos de papa, espinaca y caña de azúcar y su relación con propiedades del suelo en dos localidades de Colombia (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá). Recuperado de <http://www.bdigital.unal.edu.co/45120/1/790691.2013.pdf>

TRENADO, H. P., ORÍLIO, A. F., MÁRQUEZ-MARTÍN, B., MORIONES, E. & NAVAS-CASTILLO, J. 2011. Sweepoviruses cause disease in sweet potato and related *Ipomoea* spp.: fulfilling Koch's postulates for a divergent group in the genus begomovirus. *PloS one*, 6(11), e27329. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027329>

UMAHARAN, P., PADIDAM, M., PHELPS, R. H., BEACHY, R. N., & FAUQUET, C. M. 1998. Distribution and diversity of geminiviruses in trinidad and tobago. *Phytopathology*, 88(12), 1262–1268. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.12.1262>

VALDIVIA, A.R.; LASTRES, L; CALDERON, P. 1992. Malezas del sur de Honduras identificadas como hospederos alternos de virus transmisibles a las cucurbitáceas. *El melonero (Honduras)* (11): 1-3.

VARSANI, A., NAVAS-CASTILLO, J., MORIONES, E., HERNÁNDEZ-ZEPEDA, C., IDRIS, A., BROWN, J. K. & MARTIN, D. P. 2014. Establishment of three new genera in the family Geminiviridae: Becurtovirus, Eragrovirus and Turncurtovirus. *Archives of virology*, 159(8), 2193–2203. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2050-2>

WYANT, P. S., GOTTHARDT, D., SCHÄFER, B., KRENZ, B., & JESKE, H. 2011 The genomes of four novel begomoviruses and a new *Sida micrantha* mosaic virus strain from Bolivian weeds. *Archives of virology*, 156(2), 347–352. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0876-9>

WYATT, S. & BROWN, J. K. 1996. Detection of Subgroup III Geminivirus Isolates in Leaf Extracts by Degenerate Primers and Polymerase Chain Reaction. *Phytopathology*, 86(12), 1288. <https://doi.org/10.1094/Phyto-86-1288>

ZACHRISSON, B; POVEDA, J. 1992. Las moscas blancas en Panamá. I n *Las moscas blancas (Homoptera: Aleyrodidae) en América Central y el Caribe*. Hilje, L; Arboleda, O. Ed. CATIE, Turrialba, Costa Rica. p. 64-66.

ZACHRISSON, B., HERRERA-VÁSQUEZ, J. Á., & BERNAL, J. (2017). Plantas hospedantes de *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemíptera: Aleyrodidae), en áreas colindantes al cultivo de tomate, en la región este de Panamá. *Idesia* (Arica), 35(ahead), 0–0. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292017005000019>

ZERBINI, F. M., BRIDDON, R. W., IDRIS, A., MARTIN, D. P., MORIONES, E., NAVAS-CASTILLO, J., ICTV, R. C. 2017. ICTV Virus Taxonomy Profile: Geminiviridae. *The Journal of general virology*, 98(2), 131–133. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000738>

ANEXOS

Anexo 1. Vista general de las fincas dedicadas al cultivo de tomate industrial durante la temporada de cultivo 2016-2017.



Anexo 2. Arvenses sintomáticas de infección viral asociadas al cultivo de tomate industrial en el distrito de Los Santos temporada 2016-2017.



Anexo 3. Arvenses sin síntomas visibles de infección viral asociadas al cultivo de tomate industrial en el distrito de Los Santos temporada 2016-2017.



Anexo 4. Plantas de tomate (*S. lycopersicum*) variedad IDIAP T-8 con síntomas de infección viral presentes en las fincas tomateras en el distrito de Los Santos.



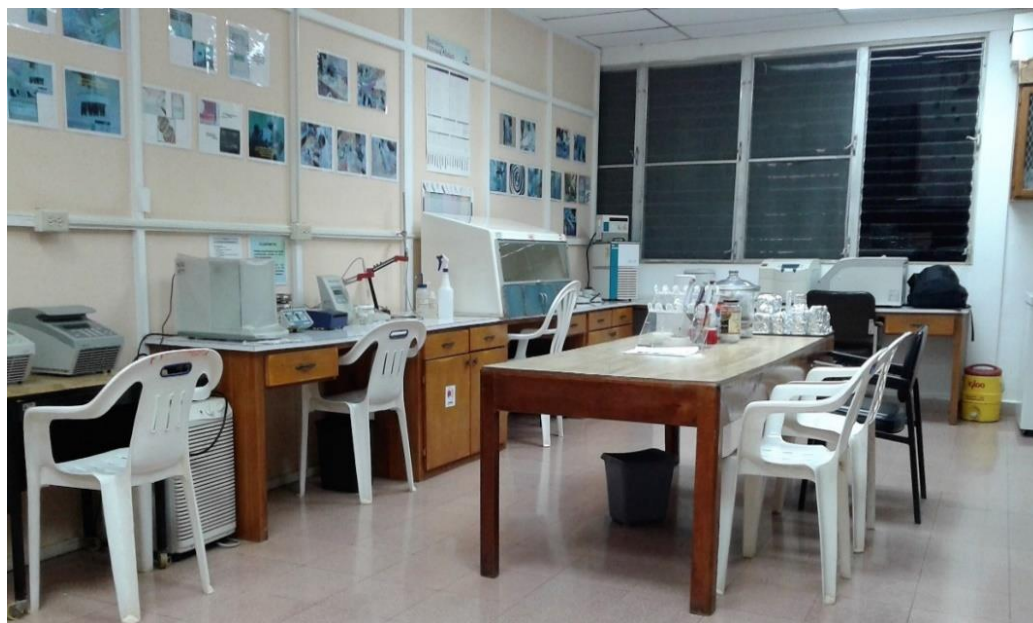
Anexo 5. Arvenses reportadas como hospederas de Begomovirus en la región de Latinoamérica y el Caribe.

Arvense hospedera	Begomovirus	País	Cita bibliográfica
<i>Abutilon</i> (Malvaceae)	<i>Abutilon Brazil virus</i> (AbBV) <i>Abutilon mosaic Bolivia virus</i> (AbMBoV)	Brazil Bolivia	Paprotka <i>et al.</i> , (2010) Wyant <i>et al.</i> , (2011)
<i>Cleome affinis</i> (Cleomaceae)	<i>Cleome leaf crumple virus</i> (CLCrV)	Brazil	Paprotka <i>et al.</i> , 2010
<i>Datura stramonium</i> (Solanaceae)	<i>Datura leaf distortion virus</i> (DaturaLDV) <i>Melon chlorotic leaf curl virus</i> -[Guatemala] (MCLCuV) <i>Tomato golden mosaic virus</i> (TGMV) <i>Tomato rugose mosaic virus</i> (ToRMV)	Venezuela Guatemala Brazil Brazil	Fiallo-Olive <i>et al.</i> , (2007) Idris <i>et al.</i> , (2008) Costa (1976) Fernandes <i>et al.</i> , (2006)
<i>Euphorbia heterophylla</i> (Euphorbiaceae)	<i>Merremia mosaic virus</i> (MerMV) <i>Euphorbia yellow mosaic virus</i> (EuYMV) <i>Euphorbia mosaic virus</i> (EuMV) <i>Euphorbia mosaic virus</i> (EuMV) <i>Euphorbia mosaic virus</i> (EuMV)	Cuba Brazil Jamaica Belize Nicaragua	Fiallo-Olivé <i>et al.</i> , 2012 Fernandes, Albuquerque <i>et al.</i> , 2011 Collins <i>et al.</i> , 2009 McLaughlin <i>et al.</i> , 2008 Ala-Poikela <i>et al.</i> , 2005;
<i>Jatropha gossypifolia</i> (Euphorbiaceae)	<i>Jatropha mosaic virus</i> -[Jamaica:Spanish Town:2004] (JMV-[JM:ST:04])	Jamaica	Roye <i>et al.</i> , 2006; Simmonds-Gordon <i>et al.</i> , 2014.
<i>Macroptilium lathyroides</i> (Fabaceae)	<i>Macroptilium yellow mosaic virus</i> [Jamaica:Mona] <i>Macroptilium golden mosaic virus</i> [Jamaica] (MGMV [JMI])	Jamaica Jamaica	Roye <i>et al.</i> , 1997 Amarakoon <i>et al.</i> , 2008
<i>Malvastrum americanum</i> (Malvaceae)	<i>Sida golden mosaic Backup virus</i> -[Jamaica:St. Elizabeth:2004] <i>Malvastrum yellow mosaic Helshire virus</i> (MaYMHV), <i>Malvastrum yellow mosaic Jamaica virus</i> (MaYMJV).	Jamaica Jamaica Jamaica	Stewart <i>et al.</i> , (2014) Graham <i>et al.</i> , 2006; Graham <i>et al.</i> , 2010.
<i>Malvastrum coromandelianum</i> (Malvaceae)	<i>Sida Yellow vein virus</i> (SiYVV)	Cuba	Fiallo-Olivé <i>et al.</i> , 2012
<i>Nicandra physaloides</i> (L.) Gaertn. (Solanaceae)	<i>Tomato severe rugose virus</i> (ToSRV) [Brazil:Sumare:Nicandra:2007]	Brazil	Barreto <i>et al.</i> , (2013)
<i>Physalis</i> sp. (Solanaceae)	<i>Tomato golden mosaic virus</i> (TGMV)	Brazil	Costa <i>et al.</i> , (1976)
<i>Rhynchosia minima</i> (Fabaceae)	<i>Rhynchosia golden mosaic Havana virus</i> (RhGMHaV) <i>Rhynchosia rugose golden mosaic virus</i> (RhRGMV). <i>Rhynchosia yellow mosaic Yucatan virus</i> (RhYMYuV)	Cuba Cuba Mexico	Fiallo-Olivé <i>et al.</i> , 2010 Fiallo-Olivé <i>et al.</i> , 2010 Hernández-Zepeda <i>et al.</i> , 2010

Continuación de anexo 5

Arvense hospedera	Begomovirus	País	Cita bibliográfica
<i>Sida</i> sp. (Malvaceae)	<i>Sida</i> Brazil virus	Jamaica	Stewart <i>et al.</i> , (2011)
	<i>Sida</i> golden mosaic Braco virus-[Jamaica:Liguanea:2008] (SidaGMBrV)	Jamaica	Stewart (2011)
	<i>Sida</i> golden mosaic Backup virus-[Jamaica:St. Elizabeth:2004] (SiGMBuV)	Jamaica	Stewart <i>et al.</i> , (2014)
	<i>Sida</i> micrantha mosaic virus (SimMV)	Brazil	Jovel <i>et al.</i> , (2004); Paprotka <i>et al.</i> , 2010
	<i>Sida</i> mosaic Bolivia virus 1 (SidaMBoV1)	Bolivia	Wyant <i>et al.</i> , (2011)
	<i>Sida</i> mosaic Bolivia virus 2 (SidaMBoV2)	Bolivia	Wyant <i>et al.</i> , (2011)
	<i>Sida</i> mottle virus (SiMoV)	Brazil	Tavares <i>et al.</i> , (2012)
	<i>Sida</i> yellow mosaic virus (SIYMV0)	Brazil	Fernandes, <i>et al.</i> , (2008)
	<i>Sida</i> yellow mottle virus (SiYMoV),	Cuba	Fiallo-Olivé <i>et al.</i> , 2012
	<i>Sida</i> golden yellow vein virus (SiGYVV)	Cuba	Echemendia, <i>et al.</i> , 2004
	<i>Sida</i> golden yellow vein virus (SiGYVV)	Jamaica	Stewart <i>et al.</i> , 2011
	<i>Sida</i> golden mosaic virus (SiGMV)	Nicaragua	Rojas <i>et al.</i> , 2000
<i>Sida</i> rhombifolia (Malvaceae)	<i>Sida</i> golden mosaic Costa Rica virus (SiGMV-Co)	Costa Rica	Höfer P, Engel M, Jeske H
	<i>Sida</i> golden mosaic Honduras virus (SiGMHV);	Honduras	Frischmuth <i>et al.</i> , (1997)
	<i>Sida</i> mosaic Sinaloa virus (SiMSinV)	México	Mauricio-Castillo <i>et al.</i> , 2014
	<i>Sida</i> yellow vein virus (SiYVV)	Central América	Frischmuth <i>et al.</i> , (1997)
<i>Wissadula amplissima</i> (Malvaceae)	<i>Macropodium</i> golden mosaic virus (MGMV)	Jamaica	Collins <i>et al.</i> , 2010
	<i>Wissadula</i> golden mosaic virus [Jamaica] (WGMV [JM1]);	Jamaica	Collins & Roye, 2007
	<i>Euphorbia</i> mosaic virus [Jamaica: StElizabeth] (EuMV [JM:SE]),	Jamaica	Roye <i>et al.</i> , 1997
<i>Jacquemontia</i> sp (Convolvulaceae)	<i>Jacquemontia</i> yellow mosaic virus (JacYMV);	Venezuela	Fiallo-Olivé <i>et al.</i> , 2014
<i>J. tamnifolia</i> (Convolvulaceae)	<i>jacquemontia</i> yellow vein virus (JacYVV)	Venezuela	Fiallo-Olivé, <i>et al.</i> , 2017

Anexo 6. Vista parcial del Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Panamá, provincia de Chiriquí.



Anexo 7. Protocolo de Dellaporta (Dellaporta, *et al.*, 1983).

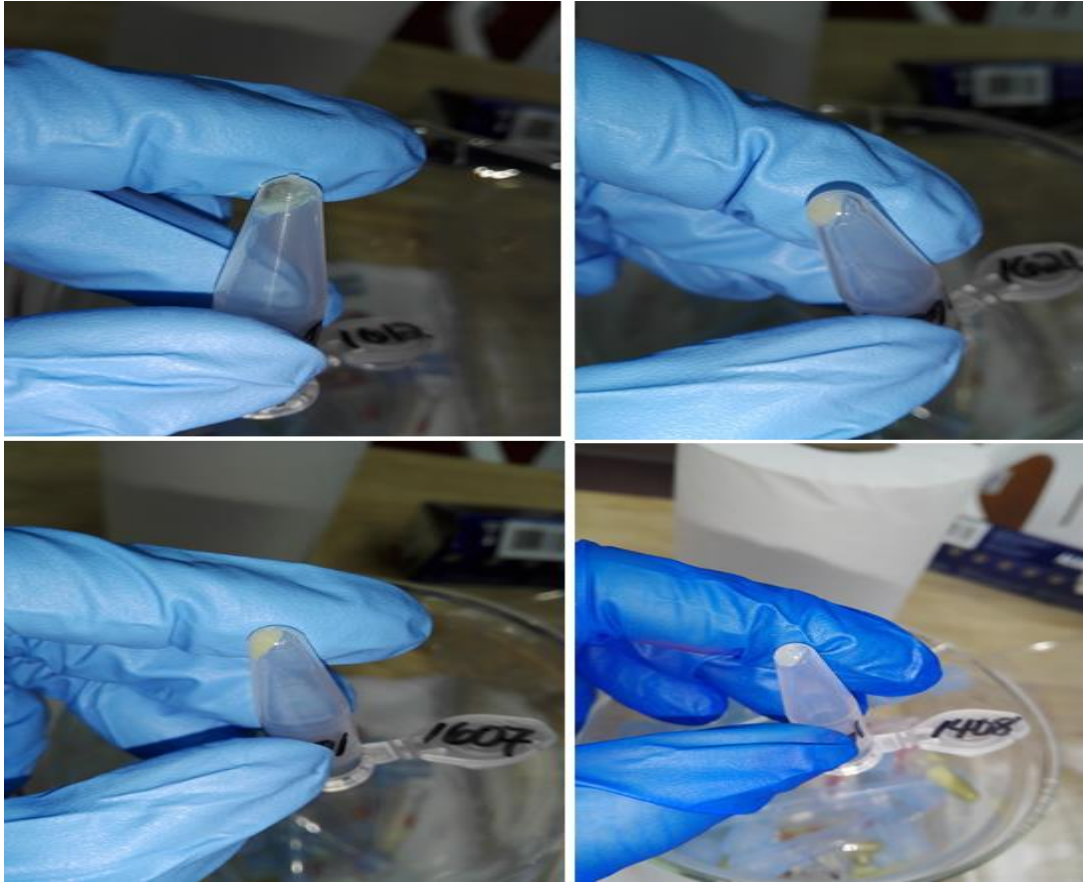
La extracción de ADN vegetal total se realizó utilizando el protocolo de Dellaporta (Dellaporta, *et al.*, 1983), el cual ofrece algunas ventajas, como fácil maceración de las muestras, permitiendo trabajar una considerable cantidad de muestras de manera rápida. A continuación, se describe el proceso de extracción:

1. Pesar aproximadamente 5 mg (0.005 mg) de tejido seco y colóquelo en un mortero o en una bolsa de plástico resistente.
2. Agregar 600 microlitros de buffer de extracción de Dellaporta y triturar el tejido
3. Recoger el sobrenadante (aprox. 510 microlitros) y colocar en un tubo de 1.5 mL
4. Agitar vigorosamente con el vortex durante 2 minutos para homogenizar.
5. Agregar 90 microlitros de SDS al 10%.
6. Agitar vigorosamente con el vortex durante 2 minutos.
7. Incubar a 65° C por 10 min, con agitación ocasional para evitar agregaciones.
8. Agregar 150 microlitros de Acetato de Potasio 5M (frío), pH 5.5.
9. Agitar vigorosamente con el vortex durante 2 minutos.
10. Centrifugar la mezcla a 14000 r.p.m. a 4 °C por 10 minutos
11. Extraer 600 microlitros del sobrenadante, evitar arrastrar el precipitado.
12. Añadir el 50% del volumen del sobrenadante (que son 600 microlitros) de isopropanol al 100% (serían 300 microlitros para un total de 900 microlitros en el

tubo).

13. Mezclar por inversión 20 veces.
14. Centrifugar la mezcla a 14000 r.p.m. a 4 °C por 10 minutos.
15. Verificar que quedó un sedimento (o pellet de ADN total de la planta que es transparente o blanco por las sales) en el fondo del tubo. Eliminar el sobrenadante, con cuidado de no perder el pellet.
16. Agregar 500 microlitros de etanol al 70% para lavar el pellet. Cuidando de no perderlo. Centrifugar a 10,000 r.p.m. durante 10 minutos
17. Eliminar el sobrenadante y observar que el pellet esté en el fondo del tubo (puede ser transparente o blanco).
18. Colocar el tubo abierto sobre una hoja de papel toalla.
19. Agregar 100 microlitros (µl) de agua destilada estéril.
20. Resuspender el precipitado succionando y botando suavemente con la micropipeta, hasta que se resuspenda completamente el ADN total (sedimento o pellet).
21. Sellar el tubo con papel Parafilm® y guardar en cajas en el congelador con temperatura a -20°C.

Figura 10. Pellet obtenido de las extracciones de ADN total utilizando el protocolo de Dellaporta (Dellaporta, *et al.*, 1983) modificado.



Anexo 8. Procedimiento para la Electroforesis en Gel de Agarosa 1.0-1.5%

Se efectuó la electroforesis para comprobar cualitativamente la presencia de ADN en las muestras analizadas.

El procedimiento utilizado para su realización fue:

1. Retirar del congelador las muestras que se les verificará la extracción de ADN para que se descongelen (manteniéndolas en una cubeta con hielo).
2. Sellar con cinta adhesiva eléctrica los lados y bordes del soporte que contendrán el gel solidificado.
3. Pesar 2 gramos de agar (depende del volumen del tamaño de la cámara) en la balanza, agregarlos al matraz y diluirlo con 200 mililitros de TAE 1X.
4. Agitar vigorosamente hasta que se diluya completamente.
5. Colocar en el microondas hasta que empiece a hervir (2 minutos aproximadamente).
6. Retirar con cuidado y agregar 6.65 microlitros de bromuro de etidio al matraz que contiene la agarosa.
7. Agregar la agarosa al soporte previamente sellado con cinta adhesiva eléctrica y colocar el peine para moldear los pocillos que contendrán la muestra. Esperar que polimerice durante 20 minutos aproximadamente, quitar el peine.
8. Rotular microtubos de 0.2 mililitros.
9. Agregar en cada microtubo 2 microlitros de Bpe (azul de bromofenol).

10. Agregar 10 microlitros de la extracción de ADN que se comprobará por electroforesis.
11. Dar pequeños golpes para que se homogenice la mezcla (Bpe + extracción de ADN).
12. Retirar la cinta de los bordes de la bandeja, y colocarla dentro de la cámara de electroforesis que contendrá el buffer de electroforesis (TAE 1X) con un volumen entre 0.5-1.0 centímetros (cm) por encima del gel.
13. Cargar los carriles con 12 microlitros de la mezcla anteriormente preparada (Bpe + extracción de ADN) con cuidado de no romper el gel y de depositarlo dentro del mismo. Una vez finalizada la colocación del ADN en los pocillos, cubrir el tanque con la tapa y conectar los cables correspondientes de los electrodos, negro (ánodo) y rojo (cátodo), en la fuente de poder. Encender la fuente y colocar 85 voltios o más dependiendo de la velocidad en que se desea que se realice la migración. Esperar durante 30-45 minutos.
14. Una vez se realizada la migración, sacar el gel de la cámara de electroforesis y colocarlo en el equipo transiluminador UV (Ultra Lum Inc., Carson, California).
15. Encender el equipo UV, apagar la luz y observar los carriles para comprobar, mediante observación de la fluorescencia, la presencia de ADN en las muestras analizadas.

Anexo 9. Protocolo de amplificación utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para efectuar la detección de Begomovirus en muestras de plantas arvenses asociadas al cultivo de tomate (*S. lycopersicum*) se realizó el procedimiento que se describe a continuación:

1. Picar hielo y colocarlo dentro de dos recipientes diferentes. Uno fue utilizado para descongelar las muestras de ADN total de las arvenses y el otro contendrá los reactivos del mix de PCR (Promega® Madison WI, U.S.A).
2. Retirar del congelador las muestras que serán analizadas mediante PCR y colocar dentro del recipiente con hielo para que se descongelen, una vez descongeladas, homogenizar con el vortex.
3. Rotular tubos que serán utilizados para depositar las muestras y el mix de PCR Promega®.
4. Calcular la cantidad necesaria de PCR Master Mix® (Promega® Madison WI, U.S.A).
5. Agregar 10 microlitros (µL) del mix a cada tubo. Agregar 2.5 microlitros (µL) de la muestra al tubo que contiene el mix del PCR Promega®. Homogenizar el contenido pipeteando suavemente.
6. Agregar 2.5 microlitros (µL) de agua al tubo que corresponderá a control de reacción.

7. Visualizar que el contenido del tubo se encuentre en la base de este. Dar pequeños golpes para homogenizar el contenido del tubo.
8. Colocar la mezcla dentro del Termociclador 2720 Applied Biosystems Thermal Cycler versión 2.09 (ThermoFisher Scientific, CA, U.S.A).
9. Ingresar el programa para la amplificación del ADN al termociclador de 2 minutos a 94 °C, 30 ciclos que comprendían tres etapas cada uno: 94 °C durante 1 min para la desnaturalización, 58 °C durante 1 min para la unión de los cebadores y 72 °C por 1 min para la extensión con volumen de reacción 12.5 microlitros (µL).
10. Pesar 0.75 gramos (g) de agarosa en la balanza, agregar al matraz y diluir con 50 mililitros (ml) de TAE 1X para preparar un gel al 1.5% con capacidad para 24 muestras.
11. Agregar 1.6 microlitros (µL) de bromuro de etidio a la solución de agarosa 1.5% y luego verterlo dentro del soporte, previamente sellado con cinta adhesiva eléctrica, y colocar el peine de electroforesis.
12. Una vez que polimerizo la agarosa y culmino la amplificación del ADN viral en el termociclador, se deposito la mezcla de 2 microlitros (µL) de tinte azul + 10 microlitros (µL) del ADN amplificado en los pocillos del gel de agarosa 1.5%.
13. Al finalizar la colocación del ADN en los pocillos, cubrir el tanque con la tapa y conectar los cables correspondientes de los electrodos, negro (ánodo) y rojo (cátodo), en la fuente de poder. Encender la fuente y colocar 85 voltios o más dependiendo de la velocidad en que se desea que se realice la migración. Esperar durante 30-45 minutos.
14. Finalizada la migración, retirar el gel de la cámara de electroforesis y colocarla en el equipo transiluminador UV (Ultra Lum Inc., Carson, California).

15. Encender el equipo UV, apagar la luz y observar los carriles para comprobar mediante observación una banda de entre 550 y 600 pares de bases que indica la presencia de Begomovirus en las muestras depositadas.

Anexo 10. Resultados obtenidos en las especies de arvenses sintomáticas y asintomáticas asociadas al cultivo de tomate industrial en el Distrito de Los Santos evaluadas mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) durante la temporada 2016-2017.

No. Finca	Temporada	Especie	Familia	Sintomática-Asintomática	PCR (+, -)	No. Muestra
1	Cultivo 2016	<i>Rhynchosia minima</i> (L.) DC	Fabaceae	S	(-)	1
	Cultivo 2016	<i>Portulaca oleraceae</i> (L.)	Portulacaceae	A	(-)	7
	Cultivo 2016	<i>Rhynchosia minima</i> (L.) DC	Fabaceae	A	(-)	8
	Cultivo 2016	<i>Euphorbia hypericifolia</i> (L.)	Euphorbiaceae	A	(-)	10
	Cultivo 2016	<i>Rhynchosia minima</i> (L.) DC	Fabaceae	S	(-)	16
	Cultivo 2016	<i>Calopogonium muconoides</i> Desv	Fabaceae	S	(-)	19
	Cultivo 2016	<i>Rhynchosia minima</i> (L.) DC	Fabaceae	S	(-)	23
2	Cultivo 2016	<i>Sida</i> spp.	Malvaceae	A	(-)	201
	Cultivo 2016	<i>Cucumis melo</i> (L.)	Cucurbitaceae	S	(-)	207
	Cultivo 2016	<i>Jatropha integerrima</i> Jacq.	Euphorbiaceae	A	(-)	213
	Cultivo 2016	<i>Cleome viscosa</i> (L.)	Cleomaceae	A	(-)	216
	Cultivo 2016	<i>Rhynchosia minima</i> (L.) DC	Fabaceae	A	(+)	217
	Cultivo 2016	<i>Malachra alceifolia</i> Jacq.	Malvaceae	A	(-)	218
3	Cultivo 2016	<i>Richardia scabra</i> (L.)	Rubiaceae	A	(-)	318
	Cultivo 2016	<i>Corchorus orinocensis</i> Kunth	Tiliaceae	A	(-)	325
	Cultivo 2016	<i>Mimosa</i> sp.	Fabaceae	A	(+)	329
4	Cultivo 2016	<i>Rhynchosia minima</i> (L.) DC	Fabaceae	S	(+)	400
	Cultivo 2016	<i>Croton hirtus</i> L'Her.	Euphorbiaceae	A	(-)	401
	Cultivo 2016	<i>Rhynchosia minima</i> (L.) DC	Fabaceae	S	(+)	403
	Cultivo 2016	<i>Physalis angulata</i> (L.)	Solanaceae	A	(-)	408
	Cultivo 2016	<i>Rhynchosia minima</i> (L.) DC	Fabaceae	S	(+)	409
	Cultivo 2016	<i>Calopogonium muconoides</i> Desv	Fabaceae	S	(+)	415
	Cultivo 2016	<i>Rhynchosia minima</i> (L.) DC	Fabaceae	A	(+)	422
	Cultivo 2016	<i>Calopogonium muconoides</i> Desv	Fabaceae	A	(+)	423
5	Cultivo 2016	<i>Calopogonium muconoides</i> Desv	Fabaceae	S	(+)	424
	Cultivo 2016	<i>Portulaca oleraceae</i> (L.)	Portulacaceae	A	(-)	501
	Cultivo 2016	<i>Cleome viscosa</i> (L.)	Cleomaceae	A	(-)	503
	Cultivo 2016	<i>Phyllanthus amarus</i> Schum. & Thonn.	Phyllanthaceae	A	(-)	504
	Cultivo 2016	<i>Rhynchosia minima</i> (L.) DC	Fabaceae	A	(+)	507

Continuación de anexo 10

No. finca	Temporada	Especie	Familia	Sintomática-Asintomática	PCR (+,-)	No. Muestra
6	Cultivo 2016	<i>Kallstroemia máxima</i> Scop	Zygophyllaceae	A	(-)	602
	Cultivo 2016	<i>Portulaca oleraceae</i> (L.)	Portulacaceae	A	(-)	604
	Cultivo 2016	<i>Eleutheranthera ruderalis</i> (Sw.) Sch.Bip	Asteraceae	A	(-)	605
	Cultivo 2016	<i>Euphorbia heterophylla</i> (L.)	Euphorbiaceae	A	(-)	607
	Cultivo 2016	<i>Malachra alceifolia</i> Jacq.	Malvaceae	A	(-)	609
	Cultivo 2016	<i>Physalis angulata</i> (L.)	Solanaceae	A	(+)	610
1	Barbecho 2016	<i>Calopogonium muconoides</i> Desv	Fabaceae	A	(-)	702
	Barbecho 2016	<i>Amaranthus spinosus</i> (L.)	Amaranthaceae	A	(-)	705
	Barbecho 2016	<i>Malvastrum americanum</i> (L.) Torr	Malvaceae	A	(+)	708
	Barbecho 2016	<i>Malachra alceifolia</i> Jacq.	Malvaceae	A	(-)	711
	Barbecho 2016	<i>Calopogonium muconoides</i> Desv	Fabaceae	S	(-)	713
	Barbecho 2016	<i>Malvastrum americanum</i> (L.)Torr	Malvaceae	S	(-)	714
	Barbecho 2016	<i>Euphorbia hypericifolia</i> (L.)	Euphorbiaceae	S	(-)	715
	Barbecho 2016	<i>Calopogonium muconoides</i> Desv	Fabaceae	S	(-)	716
	Barbecho 2016	<i>Euphorbia heterophylla</i> (L.)	Euphorbiaceae	S	(-)	721
	Barbecho 2016	<i>Calopogonium muconoides</i> Desv	Fabaceae	S	(-)	723
2	Barbecho 2016	<i>Euphorbia hypericifolia</i> (L.)	Euphorbiaceae	A	(-)	803
	Barbecho 2016	<i>Euphorbia heterophylla</i> (L.)	Euphorbiaceae	S	(-)	809
	Barbecho 2016	<i>Physalis angulata</i> (L.)	Solanaceae	A	(+)	812
	Barbecho 2016	<i>Malvastrum americanum</i> (L.) Torr	Malvaceae	A	(-)	813
	Barbecho 2016	<i>Malvastrum americanum</i> (L.)Torr	Malvaceae	S	(-)	817
	Barbecho 2016	<i>Malachra alceifolia</i> Jacq.	Malvaceae	S	(-)	819
3	Barbecho 2016	<i>Sida</i> spp.	Malvaceae	S	(-)	901
	Barbecho 2016	<i>Cucumis melo</i> (L.)	Cucurbitaceae	A	(-)	903
	Barbecho 2016	<i>Rhynchosia minima</i> (L.) DC	Fabaceae	S	(-)	904
	Barbecho 2016	<i>Rhynchosia minima</i> (L.) DC	Fabaceae	S	(+)	909
	Barbecho 2016	<i>Tridax procumbens</i> (L.)	Asteraceae	A	(-)	911
4	Barbecho 2016	<i>Calopogonium muconoides</i> Desv.	Fabaceae	S	(+)	1101
	Barbecho 2016	<i>Rhynchosia minima</i> (L.) DC	Fabaceae	S	(+)	1102
	Barbecho 2016	<i>Sida</i> spp.	Malvaceae	S	(-)	1103
	Barbecho 2016	<i>Abutilon</i> sp.	Malvaceae	A	(-)	1105
	Barbecho 2016	<i>Spiracantha cornifolia</i> Kunth	Asteraceae	A	(-)	1107

Continuación de anexo 10

No. finca	Temporada	Especie	Familia	Sintomática-Asintomática	PCR (+,-)	No. Muestra
5	Barbecho 2016	<i>Hybanthus attenuatus</i> Humb. & Bonpl. ex Roem. & Schult.	Violaceae	A	(+)	1201
	Barbecho 2016	<i>Melampodium divaricatum</i> (L. C. Rich.) DC.	Asteraceae	A	(-)	1202
6	Barbecho 2016	<i>Amaranthus dubius</i> Mart. ex Thell.	Amaranthaceae	A	(+)	1004
	Barbecho 2016	<i>Cleome viscosa</i> (L.)	Cleomaceae	A	(+)	1007
	Barbecho 2016	<i>Heliotropium indicum</i> (L.)	Boraginaceae	A	(-)	1009
	Barbecho 2016	<i>Rhynchosia minima</i> (L.) DC	Fabaceae	S	(+)	1010
	Cultivo 2017	<i>Cleome viscosa</i> (L.)	Cleomaceae	A	(+)	1302
7	Cultivo 2017	<i>Portulaca oleraceae</i> (L.)	Portulacaceae	A	(-)	1306
	Cultivo 2017	<i>Euphorbia heterophylla</i> (L.)	Euphorbiaceae	A	(-)	1308
	Cultivo 2017	<i>Rhynchosia minima</i> (L.) DC	Fabaceae	S	(+)	1311
	Cultivo 2017	<i>Heliotropium indicum</i> (L.)	Boraginaceae	A	(-)	1312
	Cultivo 2017	<i>Desmodium tortuosum</i> Desv	Fabaceae	A	(-)	1313
	Cultivo 2017	<i>Rhynchosia minima</i> (L.) DC	Fabaceae	A	(-)	1315
	Cultivo 2017	<i>Amaranthus spinosus</i> (L.)	Amaranthaceae	A	(-)	1320
	Cultivo 2017	<i>Desmodium tortuosum</i> Desv	Fabaceae	S	(-)	1323
	Cultivo 2017	<i>Hybanthus attenuatus</i> Humb. & Bonpl. ex Roem. & Schult.	Violaceae	A	(-)	1325
	Cultivo 2017	<i>Phyllanthus amarus</i> Schum. & Thonn.	Phyllanthaceae	A	(-)	1326
	Cultivo 2017	<i>Malachra alceifolia</i> Jacq.	Malvaceae	A	(-)	1327
	Cultivo 2017	<i>Corchorus orinocensis</i> Kunth	Tiliaceae	A	(-)	1405
8	Cultivo 2017	<i>Amaranthus spinosus</i> (L.)	Amaranthaceae	A	(+)	1406
	Cultivo 2017	<i>Ludwigia</i> sp.	Onagraceae	A	(-)	1407
	Cultivo 2017	<i>Momordica charantia</i> (L.)	Cucurbitaceae	A	(-)	1410
	Cultivo 2017	<i>Jatropha gossypifolia</i> (L.)	Euphorbiaceae	A	(-)	1411
	Cultivo 2017	<i>Jatropha gossypifolia</i> (L.)	Euphorbiaceae	A	(-)	1412
	Cultivo 2017	<i>Malachra alceifolia</i> Jacq.	Malvaceae	A	(-)	1413
	Cultivo 2017	<i>Physalis angulata</i> (L.)	Solanaceae	A	(-)	1414
	Cultivo 2017	<i>Jatropha gossypifolia</i> (L.)	Euphorbiaceae	A	(-)	1416
	Cultivo 2017	<i>Ludwigia</i> sp.	Onagraceae	A	(-)	1417
	Cultivo 2017	<i>Melochia</i> sp.	Sterculiaceae	A	(-)	1418

Continuación de anexo 10

No. finca	Temporada	Especie	Familia	Sintomática-Asintomática	PCR (+,-)	No. Muestra
9	Cultivo 2017	<i>Kallstroemia máxima</i> Scop.	Zygophyllaceae	A	(-)	1500
	Cultivo 2017	<i>Melochia pyramidata</i> (L.)	Sterculiaceae	A	(-)	1502
	Cultivo 2017	<i>Amaranthus spinosus</i> (L.)	Amaranthaceae	A	(+)	1504
	Cultivo 2017	<i>Portulaca oleraceae</i> (L.)	Portulacaceae	A	(-)	1505
	Cultivo 2017	<i>Sida</i> spp.	Malvaceae	A	(-)	1509
	Cultivo 2017	<i>Physalis angulata</i> (L.)	Solanaceae	A	(+)	1511
	Cultivo 2017	<i>Eleutheranthera ruderalis</i> (Sw.) Sch.Bip.	Asteraceae	A	(-)	1521
10	Cultivo 2017	<i>Rhynchosia minima</i> (L.) DC	Fabaceae	S	(-)	1600
	Cultivo 2017	<i>Physalis angulata</i> (L.)	Solanaceae	A	(+)	1602
	Cultivo 2017	<i>Kallstroemia maxima</i> Scop.	Zygophyllaceae	A	(-)	1605
	Cultivo 2017	<i>Heliotropium indicum</i> (L.)	Boraginaceae	A	(-)	1606
	Cultivo 2017	<i>Cleome viscosa</i> (L.)	Cleomaceae	A	(+)	1608
	Cultivo 2017	<i>Malachra alceifolia</i> Jacq.	Malvaceae	A	(+)	1610
	Cultivo 2017	<i>Borreria laevis</i> (Lam.) Griseb.	Rubiaceae	A	(-)	1612
	Cultivo 2017	<i>Rhynchosia minima</i> (L.) DC	Fabaceae	A	(-)	1614
	Cultivo 2017	<i>Euphorbia heterophylla</i> (L.)	Euphorbiaceae	S	(-)	1615
	Cultivo 2017	<i>Euphorbia heterophylla</i> (L.)	Euphorbiaceae	S	(-)	1617
	Cultivo 2017	<i>Euphorbia heterophylla</i> (L.)	Euphorbiaceae	S	(-)	1621
	Cultivo 2017	<i>Rhynchosia minima</i> (L.) DC	Fabaceae	A	(-)	1623
	Cultivo 2017	<i>Rhynchosia minima</i> (L.) DC	Fabaceae	S	(-)	1625

